Jean-Jacques CALLEC

ETUDE DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL D'UN INSECTE (*Periplaneta americana*)

UNIVERSITÉ DE RENNES 1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552708_0006

SÉRIE : C
N° D'ORDRE : 153
N° DE SÉRIE : 47

THESE

présentée

devant L'UNIVERSITE DE RENNES

U. E. R. SCIENCES BIOLOGIQUES

pour obtenir

Le grade de DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Jean-Jacques CALLEC

ETUDE DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL D'UN INSECTE (*Periplaneta americana*): Aspects electrophysiologiques et pharmacologiques.

Soutenue le 25 mai 1972 devant la Commission d'Examen

M. BOISTEL, Professeur	Président
M. RAZET, Professeur M. RICHARD, Professeur M. TAUC, Directeur de recherche C.N.R.S. M. GERSCHENFELD, Maître de recherche C.N.R.S.	Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIB.

UNIVERSITE DE RENNES

U.E.R. issues de la FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires

M. MILON Y.
M. TREHIN R.
M. SCHMITT M.
M. LE MOAL H.
M. MARTIN Y.
M. BOCLE J.

Professeurs Honoraires

M. FREYMANN R.
M. HAGENE P.
M. POISSON R.
M. ROHMER R.
M. TREHIN R.
M. SALMON-LEGAGNEUR F.
M. des ABBAYES H.
M. MILON Y.

Maîtres de Conférences Honoraires

M. GRILLET L.
M. LECRECQ A.

Mathématiques

Professeurs

Melle CHARPENTIER M.
M. GUERINDON J.
M. METIVIER M.
M. GIORGIUTTI I.
M. BRUNEL A.
M. TOUGERON J. C.
M. MIGNOT A.

Maîtres de Conférences & Chargés de Cours

M. LEGOUPIL J.
M. HOUDEBINE J.
M. EUVRARD D.
M. NEDELEC J. C.
M. VERJUS J. P.
M. TRILLING L.
M. FERRAND D.
M. GUIVARC'H Y.
M. KEANE M. (M. C. associé)
M. GILDELAMADRID (Prof. associé)

Physique

M. VACHER M.
M. VIGNERON L.
M. LE BOT J.
Mme ROBIN née SALOMOND
M. ROBIN S.
M. LE MONTAGNER S.
M. MEVEL J. Y.
M. MEINNEL J.
M. REGENSTREIF E.
M. BRUN P.
M. LE ROUX E.
M. DUBOST
M. GUIDINI
M. HAEUSLER C.
M. ARQUES P. Y.
M. DECAMPS E.
M. NUSIMOVICI M. A.

Chimie

M. VENE J.
M. LE MOAL H.
M. LEVAS E.
M. PELTIER D.
M. PRIGENT J.
M. JOUAN P.
M. FOUCAUD A.
M. LANG J.
M. CARRIE R.
M. GUERILLOT C.
M. KERFANTO M.
M. DABARD R.
M. GRANDJEAN D.
M. LUCAS J.
M. DUVAL J.
M. MARTIN G.

Zoologie

M. RICHARD G.
M. MAILLET P.
M. BOISTEL J.
M. RAZET P.
M. FOLLIOT R.
M. ALLEGRET P.
M. MANIEY J.
M. JOLY J.
M. POSTEL (Professeur associé)
M. LEFEUVRE J.C.

Botanique

M. VILLERET S.
M. CLAUSTRES G.
Melle GOAS M.
Melle GOAS G.
Mme LEMOINE C.
M. TOUFFET

Géologie

M. COGNE J.
Melle DURAND S.
M. PHILIPPOT A.
M. BOILLOT G.
M. HAMEURT J.

Le Secrétaire Général de l'Université

M. BOURDIGUEL R.

SOMMAIRE

INTRODUCTION. 1

Première partie : DONNEES ACTUELLES SUR LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL DES INSECTES. 5

- Quelques aspects essentiels de la transmission synaptique dans le système nerveux central (SNC). 7
- Transmission synaptique chez les Insectes . 11

Chapitre I : DONNEES STRUCTURALES ET ULTRASTRUCTURALES. 13

A - La gaine nerveuse. 13

B - Les corps cellulaires. 15

C - Le neuropile. 16

Chapitre II : DONNEES ELECTROPHYSIOLOGIQUES. 21

A - Enregistrement par électrodes externes. 21

B - Enregistrement par microélectrodes capillaires. 22

1 - Chez *Periplaneta fuliginosa* 24

2 - Chez *Gryllus campestris* 24

3 - Chez *Schistocerca gregaria* 26

4 - Chez *Periplaneta americana* 27

a) Techniques utilisées . 28

b) Résultats. 30

α - Activités ganglionnaires périphériques. 30

β - Activités synaptiques neuropilaires. 32

Chapitre III :DONNEES BIOCHIMIQUES, HISTOCHIMIQUES ET PHARMACOLOGIQUES. 39

A - Données biochimiques et histochimiques : identification et localisation des médiateurs possibles. 41

1 - Système cholinergique. 41

a) Acétylcholine . 41

b) Acétylcholinestérase . 45

c) Cholineacétylase 47

2 - Autres substances présentes dans le SNC des Insectes. 48

a) Acides aminés. 48

b) Catécholamines. 52

c) Sérotonine . 53

B - Données pharmacologiques et électrophysiologiques. 54

1 - Système cholinergique. 55

a) Action de l'acétylcholine. 55

α - Action de l'ACh sur le ganglion A_6 55

β - Action de l'ACh sur les corps cellulaires du ganglion A_6. 56

b) Action de substances analogues à l'ACh 58

α - Substances " agonistes ". 58

β - Action de substances antagonistes. 59

. d - tubocurarine. 59

. Atropine . 60

c) Action de substances anticholinestérasiques. 61

2 - Acide γ - aminobutyrique (GABA). 63

3 - Catécholamines. 65

4 - Sérotonine. 66

Conclusion. 68

Deuxième partie. 73

Chapitre I : DONNEES ANATOMIQUES SUR LE SYSTEME " RECEPTEURS CERCAUX - FIBRES CERCALES -FIBRES GEANTES" CHEZ *Periplaneta americana*. 75

A - Les cerques et les récepteurs cercaux. 75

B - Les fibres géantes. 79

1 - Aux niveaux abdominal et thoracique . 79

2 - Au niveau A_6. 84

C - La jonction synaptique. 87

Chapitre II : LA TECHNIQUE " FIBRE ISOLEE-OIL-GAP ": DISSECTION MISE EN PLACE, AVANTAGES. 91

A - Dissection d'une fibre géante. 93

B - Mise en place. 97

C - Avantages de cette technique. 100

Chapitre III : MATERIEL ET TECHNIQUES. 103

A - Matériel biologique. 103

B - Conditions expérimentales. 104

1 - Facteurs physiques (température, pH, pression osmotique). 104

2 - Liquides physiologiques. 105

3 - Action des gaz. 106

C - Techniques d'enregistrement. 107

1 - Enregistrement au niveau d'un récepteur cercal. 107

2 - Enregistrement au niveau des nerfs sensitifs. 107

3 - Enregistrement au niveau postsynaptique. 108

D - Techniques de stimulation. 112

1 - Stimulation des mécanorécepteurs. 112

2 - Stimulation des nerfs cercaux afférents 112

3 - Polarisation électrique de la fibre géante. 112

E - Techniques pharmacologiques. 116

F - Appareillage utilisé. 119

Troisième partie: RESULTATS EXPERIMENTAUX. 121

Chapitre I : ANALYSE DES POTENTIELS POSTSYNAPTIQUES. 123

A - Potentiels postsynaptiques unitaires. 123

1 - PPSEs unitaires liés à l'activité de nombreux mécano-récepteurs. 126

2 - PPSEs unitaires liés à l'activité d'un seul mécano-récepteur. 127

3 - PPSIs unitaires. 129

a) PPSIs " spontanés ". 130

b) PPSIs " unitaires " cercaux. 133

4 - Discussion. 134

a) PPSEs unitaires. 134

b) PPSIs unitaires. 135

B - Potentiels postsynaptiques résultant de la stimulation synchrone ou asynchrone d'un nombre plus ou moins grand d'éléments pré-synaptiques. 138

1 - Effets dus à la stimulation mécanique des récepteurs cercaux. 138

a) Effets transmis par les nerfs XI . 138

b) Effets transmis par les nerfs X. 141

2 - Effets dus à la stimulation électrique des nerfs cercaux 141
a) Stimulation des nerfs XI. 141
α- Réponse initiale (= réponse monosynaptique). 141
β- Réponses retardées. 144
b) Stimulation des nerfs X. 148
C - Potentiels d'inversion des PPSEs et des PPSIs . 151
1 - Relation voltage-courant. 151
2 - Potentiels d'inversion des potentiels postsynaptiques. 153
a) Action du courant sur le PPSE. 153
b) Potentiel d'inversion des PPSIs. 154
3 - Discussion. 156
D - Interactions entre PPSE et PPSI. 159
E - Conclusion partielle. 163

Chapitre II : STIMULATION REPETITIVE DES RECEPTEURS ET DES AFFERENCES CERCALES: ETUDE DE QUELQUES FACTEURS POUVANT AFFECTER L'EFFICACITE DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE. 167
A - Différentes catégories de messages sensoriels excitateurs. 169
1 - Messages de type phasico-tonique. 169
2 - Messages de type phasique. 170
B - Stimulation répétitive d'une seule afférence. 171
1 - Stimulation naturelle de différentes catégories de mécano-récepteurs. 171
a) Réponses à un message de type phasico-tonique. 171
b) Réponses à un message de type tonique. 172
c) Réponses à un message de type phasique. 175
2 - Stimulation électrique d'un seul récepteur. 179
C - Stimulation répétitive de plusieurs afférences. 181
1 - Stimulation naturelle des cerques. 181
2 - Stimulation électrique répétitive des nerfs cercaux. 183
a) Stimulation des nerfs XI. 183
α- Action sur le PPSE évoqué monosynaptique. 183
β- Action sur les PPSEs retardés. 185
b) Stimulation des nerfs X : action sur le PPSI disynaptique. 185

D - Discussion : facilitation, dépression et habituation. 186

1 - Facilitation synaptique. 187

2 - Dépression synaptique. 190

3 - Habituation. 193

E - Conclusion partielle. 195

Chapitre III : INFLUENCES DE FACTEURS ESSENTIELS A LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE: IMPORTANCE DE L'ENVIRONNEMENT INTRAGANGLIONNAIRE. 199

A - Rôle de l'oxygène et du gaz carbonique. 199

1 - Résultats expérimentaux. 199

2 - Discussion. 206

B - Rôle des ions Ca^{++} et Mg^{++}. 209

1 - Données générales. 209

2 - Résultats. 211

a) Action des ions Ca^{++} 212

α - Action sur les PPSEs unitaires. 212

β - Action sur le PPSE évoqué. 214

γ - Action sur les PPSIs. 218

b) Action des ions Mg^{++}. 220

α - Action sur les PPSEs. 220

β - Action sur les PPSIs. 223

3 - Discussion. 224

a) Action des ions Ca^{++}. 224

b) Action des ions Mg^{++}. 225

c) Rôle des ions Ca^{++} et Mg^{++} dans le ganglion entier. 226

C - Conclusion. 228

Chapitre IV : ASPECTS PHARMACOLOGIQUES DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE. 231

A - L'acétylcholine est-elle médiateur chimique chez la Blatte ? 231

1 - Quelques données sur la structure de l'ACh, d'agonistes, d'antagonistes et de cholinorécepteurs. 232

a) ACh, agonistes et cholinorécepteurs. 232

b) Curare et atropine : données actuelles sur leurs sites d'action. 234

2 - Résultats. 238

a) Injection ionophorétique d'ACh. 238

α - Action de l'ACh sur l'élément postsynaptique. 238

β - Action de l'ACh sur les terminaisons présynaptiques. 243

b) Action de l'ACh sur le ganglion A_6 entier dégainé. 244

c) Action de substances agonistes de l'ACh. 245

α - Action de la nicotine. 245

β - Action de l'acétyl- β -méthylcholine. 245

d) Action de substances antagonistes de l'ACh. 246

α - d - tubocurarine 246

- Action du curare sur les PPSEs et PPSIs évoqués. 246

- Action de curare sur les PPSEs et PPSIs unitaires. 247

. Action sur les PPSEs unitaires. 247

. Action sur les PPSIs unitaires "spontanés." 248

- Action du curare sur le PPS-ACh. 250

β - Atropine. 252

- Action de l'atropine sur les PPSEs unitaires et évoqués. 252

- Action de l'atropine sur le PPS-ACh. 254

e) Action d'une anticholinestérase : l'ésérine. 254

α - Action de l'ésérine sur les PPSEs unitaires et évoqués. 254

β - Action de l'ésérine sur le PPS-ACh. 258

γ - Discussion : effets pré- et postsynaptiques de l'ésérine. 258

3 - Conclusion partielle. 261

B - L'acide γ- aminobutyrique (GABA) est-il médiateur chimique chez la Blatte ? 265

1 - Introduction. 265

2 - Résultats. 266

a) Injection ionophorétique de GABA. 266

b) Action du GABA sur le ganglion A_6 entier dégainé. 269

c) Action d'une substance antagoniste: la picrotoxine. 270

α-Action de la picrotoxine sur les PPSIs unitaires "spontanés". 270

β-Action de la picrotoxine sur les PPSIs "unitaires" évoqués. 271

γ-Action de la picrotoxine sur les PPSIs évoqués. 272

δ-Action présynaptique de la picrotoxine. 274

3 - Discussion. 275

4 - Conclusion partielle. 278

- Conclusions générales et perspectives d'avenir. 281

- Références bibliographiques. 295

A ma femme

AVANT-PROPOS

Les recherches que nous exposerons au cours de ce mémoire ont été effectuées au Laboratoire de Physiologie Animale de l'U.E.R. des Sciences Biologiques de Rennes dirigé par Monsieur le Professeur BOISTEL. Je le remercie vivement de m'y avoir accueilli et lui suis très reconnaissant pour les facilités qu'il m'a accordées pour l'acquisition des principales techniques électrophysiologiques.

Je dois à Monsieur le Professeur RICHARD mes premiers contacts avec le système nerveux central des Insectes. Sa compétence et son enthousiasme communicatif ont grandement contribué à renforcer la détermination que j'avais d'entreprendre des recherches dans cette voie difficile. Je suis très heureux et très honoré de le retrouver au sein de ce jury et lui suis très reconnaissant du dévouement dont il a encore fait preuve à cette occasion.

J'exprime également ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur RAZET, Directeur de l' U.E.R. des Sciences Biologiques, qui m'a enseigné les bases de la Zoologie, et a accepté aujourd'hui, malgré ses lourdes tâches, de juger ce travail. Son amabilité et son dévouement ont été très précieux pour assurer les meilleures conditions au fonctionnement de ce jury.

Je remercie tout particulièrement Messieurs les Professeurs TAUC et GERSCHENFELD pour les entretiens qu'ils ont bien voulu m'accorder et pour les nombreuses critiques éclairées qu'ils m'ont si généreusement prodiguées. Je suis d'autre part très sensible à l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Que mon épouse trouve ici le reflet de ma reconnaissance affectueuse pour son constant et fidèle soutien au cours de ces nombreuses années de recherche et pour l'aide importante qu'elle m'a apportée au cours de la mise en forme du mémoire.

Enfin, je voudrais remercier très sincèrement Madame LE GUEN qui n'a jamais ménagé son temps pour assurer la réalisation matérielle complète de ce mémoire, et tout ceux qui, d'une manière ou d'une autre m'ont aidé dans cette tâche.

Abréviations utilisées

SNC	: système nerveux central
Ganglions A_5 et A_6	: cinquième et sixième ganglions abdominaux de *Periplaneta americana L.*
Ganglion T_3	: ganglion métathoracique
PPS	: potentiel postsynaptique
PPSE	: potentiel postsynaptique excitateur
PPSI	: potentiel postsynaptique inhibiteur
E_{PPSE}	: potentiel d'inversion du PPSE
E_{PPSI}	: potentiel d'inversion du PPSI
E_{Na}, E_K, E_{Cl} ...	: potentiels d'équilibre des ions Na^+, K^+, Cl^- ...
ACh	: acétylcholine
ChAc	: cholineacétylase
AChE	: acétylcholinestérase
Anti-ChE	: anticholinestérase
Physost.	: physostigmine (= ésérine)
DFP	: diisopropylfluorophosphate
TEPP	: tétraéthylpyrophosphate
HETP	: hexaéthyltétraphosphate
d-TC	: d - tubocurarine
GABA	: acide γ- aminobutyrique
Picro	: picrotoxine
Pot. d'ACh	: potentiel développé par l'injection ionophorétique d'ACh
Pot. GABA	: potentiel développé par l'injection ionophorétique de GABA
mM	: concentration en millimoles par litre
M	: concentration en moles par litre
g/ml	: concentration en grammes par millilitre
g/L	: concentration en grammes par litre
µm	: 10^{-6} mètre
nm	: 10^{-9} mètre
$\mathring{A}$	: angström = 10^{-1} nm
[Ca]	: concentration en calcium
mn	: minute
Rm	: résistance membranaire

Introduction

Il ne fait aucun doute que les Invertébrés ont déjà apporté une part considérable à l'élaboration des lois présidant au fonctionnement du système nerveux. Cependant, l'examen de la littérature dans ce domaine montre, que l'immense classe des Insectes (800.000 espèces) a apporté relativement peu d'éléments à cet édifice, notamment en ce qui concerne la transmission synaptique. Cela est sans doute lié à la taille relativement petite des cellules nerveuses, et en particulier de leurs corps cellulaires, chez ces animaux . Dans ces conditions il semblait difficile, voire souvent impossible, d'appliquer à l'étude des phénomènes synaptiques centraux, les techniques classiques de l'électrophysiologiste.

C'est en fait la recherche de structures relativement accessibles, (les fibres géantes) (1) qui a conduit plus particulièrement notre intérêt au niveau du dernier ganglion abdominal de la Blatte, *Periplaneta americana L.* Le choix de cet Insecte et de ce ganglion est également motivé par l'état d'avancement des recherches dans ce domaine. En effet, le dernier ganglion abdominal, appelé plus souvent sixième ganglion (ganglion A_6),a fréquemment été utilisé comme support à des études pharmacologiques et en particulier à l'iden-

(1) Récemment, PICHON (Thèse, 1969), en utilisant le même matériel , a dégagé les principales lois du tissu conducteur et montré que les fibres géantes fonctionnent de manière tout à fait classique .

tification du médiateur impliqué dans la transmission entre les informations d'origine cercale et les fibres géantes. De nombreux arguments essentiellement d'ordre pharmacologique (nous aurons l'occasion d'y revenir) militent en faveur de l'Acétylcholine (ACh). Cependant, la somme des critères indispensables à la reconnaissance définitive de l' ACh comme médiateur chez les Insectes reste insuffisante, ce qui faisait dire à COLHOUN en 1963 b :

" un très sérieux déficit est le manque de bonnes données électrophysiologiques. A cet effet, des techniques de microélectrodes et de microinjections sembleraient constituer la seule réponse à une analyse intime de la membrane postsynaptique et des effets de l'ACh sur cette membrane ".

Plus récemment, MANDELSTAM (1969), a rassemblé les particularités fonctionnelles et structurales de la transmission synaptique chez les Insectes, dans le cadre de ses propres recherches sur le système cholinergique; il affirmait notamment que " pour fournir une solution définitive à cette question, il faut qu'il y ait des expériences physiologiques, et pour une analyse pharmacologique de la transmission synaptique, le sixième ganglion abdominal de *Periplaneta americana L.* se montre particulièrement commode ".

C'est dans cette optique que nous avons porté nos efforts sur cet Insecte en essayant, dans un premier temps, de tirer au mieux parti des techniques classiques (microélectrode capillaire, par exemple) et par la suite, compte-tenu des grandes difficultés que nous avons rencontrées, d'ajuster une technique qui nous a permis d'améliorer considérablement les possibilités expérimentales (à savoir la technique de l'oil-gap sur fibre isolée, que nous présenterons plus loin).

Au cours du travail que nous exposerons dans le présent mémoire, nous avons été conduit, tout en recherchant les meilleures conditions expérimentales, à analyser les caractéristiques électriques et pharmacologiques qui accompagnent la transmission synaptique entre les fibres sensorielles d'origine cercale et les fibres nerveuses géantes. Nous avons surtout cherché à circonscrire un système neuronique relativement simple et pour cela nous avons:

- déterminé les principales afférences et les types d'influences qu'elles exercent,
- étudié les caractéristiques électrophysiologiques d'un tel système,

- dégagé les principaux facteurs pouvant affecter cette transmission et enfin,

-tenté l'identification du ou des médiateurs chimiques impliqués .

En définitive, nous nous sommes proposés d'étudier, à l'échelon unitaire, le fonctionnement d'un système intégrateur, ce qui implique un contrôle aussi complet que possible des paramètres mis en jeu .

Première partie

Données actuelles sur la transmission synaptique dans le système nerveux central des insectes.

QUELQUES ASPECTS ESSENTIELS DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC).

De nos jours, par suite des développements considérables que permet la microscopie électronique, la théorie neuronique est unanimement adoptée; elle repose sur le fait que chaque neurone est une cellule nerveuse parfaitement individualisée et limitée par une membrane. Cette théorie implique que les cellules nerveuses établissent, au sein du système nerveux, leurs connexions fonctionnelles par contiguité, et non par continuité, au niveau de zones anatomiquement différenciées, auxquelles SHERRINGTON (1897) a donné le nom de "synapses ".

La synapse ainsi définie englobe des régions fonctionnellement spécialisées pour la transmission de l'excitation ou de l'inhibition d'un élément au suivant, dans une direction unique. Une définition plus moderne doit comprendre l'organisation sub-microscopique complexe, aussi bien de la partie présynaptique que de la partie postsynaptique de la jonction. Elle doit tenir compte également des mécanismes neurochimiques spécifiques où interviennent médiateurs, substances réceptrices, enzymes jouant un rôle dans la synthèse et l'inactivation des médiateurs. De plus en plus, les synapses tendent même à être interprétées et comprises en termes moléculaires.

D'après ECCLES (1964), " le haut pouvoir de résolution du microscope électronique a permis de révéler que malgré la grande diversité de types de synapses rencontrés chez différents animaux, il existe une remarquable uniformité dans les structures supposées être essentiellement concernées dans les fonctions de transmission ".

L'étude ultrastructurale révèle tout d'abord qu'il existe une "fente ou espace synaptique" de 100 à 300 Å (10 à 30 nm) qui sépare totalement la surface membranaire des terminaisons présynaptiques, de celle de la cellule postsynaptique. En dehors de ces zones de contact entre cellules spécialisées, on observe généralement la présence de prolongements de cellules satellites (cellules gliales, cellules de Schwann) dont le rôle est encore relativement mal connu.

En outre, on observe la présence de nombreuses vésicules synaptiques de 300 à 600 Å de diamètre, localisées essentiellement dans les arborisations terminales. Elles tendent à se rassembler en grappes auprès de zones particulièrement épaisses et denses de la membrane présynaptique , face à l'espace synaptique. De telles zones, pense - t - on, joueraient un rôle particulier dans la libération du médiateur dans la fente synaptique, lequel pourrait être contenu dans les vésicules synaptiques. La membrane postsynaptique présente également de semblables épaississements membranaires, souvent face à ceux de la membrane présynaptique. Ils contiendraient les sites récepteurs spécifiques du médiateur libéré et les canaux ioniques qui leur seraient associés.

On pense généralement que la réaction résultant de la combinaison entre le médiateur chimique et certains sites récepteurs postsynaptiques , entraîne des variations locales de perméabilité à une ou plusieurs sortes d'ions. Les courants ioniques ainsi engendrés conduisent à des variations du potentiel membranaire (dépolarisation ou hyperpolarisation). Ces variations dépendent essentiellement de la nature du médiateur, des récepteurs postsynaptiques et de la concentration ionique intracellulaire.

Les études neurophysiologiques permettent de distinguer fondamentalement deux types de synapses : excitatrices et inhibitrices .

1) Synapses excitatrices : Dans ce cas, la membrane se dépolarise et donne lieu à un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE). Le potentiel membranaire tend à se déplacer vers le potentiel d'inversion du PPSE (E_{PPSE}) dont la valeur est fonction de la nature du ou des canaux ioniques ouverts, du coefficient de perméabilité de chacun des ions impliqués et de la concentration relative des ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. E_{PPSE} varie, à la plupart des synapses excitatrices connues, entre 0 et - 20 mV. Si l'action du médiateur entraînait l'ouverture des pores à une seule catégorie d'ions, E_{PPSE} pourrait être donné par le potentiel d'équilibre de cet ion, soit E_{Na}, E_{Cl}, E_K, etc ... (équations de NERNST). Etant donné que dans l'environnement normal, et compte-tenu du rapport des concentrations entre l'extérieur et l'intérieur, E_{Na} est positif tandis que E_{Cl} et E_K ont des valeurs habituellement très proches du potentiel de repos, les canaux ouverts par le médiateur excitateur permettent le passage des ions Na^+ et au moins d'une autre catégorie d'ions (K^+ et peut-être Ca^{++} ou NH_4^+) (GINSBORG, 1967).

2) Synapses inhibitrices: Les phénomènes inhibiteurs postsynaptiques sont associés à la formation d'un potentiel postsynaptique inhibiteur (PPSI) dont le potentiel d'inversion (E_{PPSI}) est toujours voisin du potentiel de repos. Les valeurs enregistrées chez divers animaux révèlent que E_{PPSI} s'établit entre une légère dépolarisation et une hyperpolarisation qui peut aller jusqu'à 25 mV. Autrement dit, l'action du médiateur ouvre des pores ioniques dont les courants tendent à maintenir (on peut aussi dire à "clamper") le potentiel de membrane au voisinage de sa valeur de repos. Dans la plupart des cas, cela se traduit par une hyperpolarisation. Seuls E_{Cl} et E_K ont des valeurs voisines de E_{PPSI}. Il a été démontré sur de nombreuses préparations, qu'effectivement le médiateur inhibiteur ouvre soit des pores au Cl^-, soit au K^+.

Bien souvent, les cellules du SNC sont soumises à un grand nombre d'influences sous-liminaires, aussi bien excitatrices qu'inhibitrices, qui se présentent sous la forme de potentiels postsynaptiques de faible amplitude . Chacun d'eux est lié à l'action d'un potentiel d'action présynaptique. On leur donne le nom de PPSEs et de PPSIs unitaires. Le neurone postsynaptique n'engendre un potentiel d'action propagé, bien souvent à partir d'une zone

particulièrement excitable, plus ou moins éloignée des sites synaptiques, appelée " site d'initiation des influx " , que si la somme des PPSEs et PPSIs unitaires (par le jeu des sommations temporelles ou spatiales) est suffisante pour atteindre le seuil. On donne souvent le qualificatif " d'intégrateur " à ces neurones.

Un tel réseau neuronique se complique bien souvent par l'existence d'influences indirectes, par exemple sur les terminaisons présynaptiques elles-mêmes, ce qui peut donner lieu à de la facilitation ou de l'inhibition présynaptiques. Il s'y ajoute souvent une propriété inhérente à l'intervention d'un médiateur chimique, à savoir la possibilité d'épuisement du contenu présynaptique (fatigabilité).

TRANSMISSION SYNAPTIQUE CHEZ LES INSECTES

Nous avons déjà noté que les travaux qui y sont consacrés demeurent relativement peu nombreux. Ils ont fait l'objet de quelques revues récentes. Trois sont exclusivement réservées à la transmission synaptique chez les Insectes (BOISTEL, 1968; MANDELSTAM, 1969; PITMAN, 1970) et une s'adresse aux mécanismes cellulaires fondamentaux du comportement (HOYLE, 1970). MANDELSTAM a surtout dressé le bilan des résultats de l'école russe; disons tout de suite qu'ils traitent essentiellement de la pharmacologie et que les travaux ne comportent aucune étude à l'échelon unitaire.

Les progrès réalisés jusqu'à ce jour semblent être étroitement liés à l'évolution des techniques. Elles sont d'ordre histo-cytologique (associées souvent à des ablations ayant entraîné de la dégénérescence), biochimique et histochimique, électrophysiologique et pharmacologique . Deux ou plusieurs de ces techniques sont parfois associées bien que les données ultrastructurales ont souvent été acquises isolément.

Considérons plus particulièrement les résultats électrophysiologiques; nous sommes tentés de les séparer en deux grandes catégories selon qu'ils ont été obtenus par dérivation externe globale (enregistrements extracellulaires), souvent associée d'ailleurs à des techniques pharmacologiques, ou par microélectrode (la plupart du temps il s'agit de microélectrodes capillaires).

La pharmacologie a bien souvent été utilisée pour l'étude des insecticides mais nous ne parlerons que des données exclusivement liées à la transmission synaptique.

C'est précisément sur la Blatte *Periplaneta americana* et en particulier au niveau du sixième ganglion abdominal (ganglion A_6) que l'on possède les études les plus anciennes et les plus nombreuses portant sur la transmission synaptique chez les Insectes. Compte-tenu de ce fait, nous passerons en revue les résultats acquis par les différentes techniques chez cet Insecte tout en y ajoutant, lorsque cela nous paraîtra particulièrement intéressant, les principales données se rapportant à d'autres espèces. Le chapitre qui suit risque de paraître relativement long. Il nous a cependant semblé particulièrement important d'élaborer cette synthèse car, notamment en ce qui concerne les données pharmacologiques chez les Insectes, nous ne disposons que des revues de COLHOUN (1963 b) et CHADWICK (1963), encore sont-elles exclusivement réservées au système cholinergique.

Nous rassemblerons les données acquises, selon le plan qui suit :

- Données structurales et ultrastructurales ;
- Données électrophysiologiques obtenues par :
  - . électrodes externes
  - . microélectrodes intracellulaires ;
- Données biochimiques, histochimiques et pharmacologiques (ces dernières associées à l'électrophysiologie).

Cette façon de procéder reste relativement arbitraire dans la mesure où certains auteurs ont eu recours à l'association de deux techniques ou même davantage .

Chapitre I

Données structurales et ultrastructurales.

Il ne semble pas nécessaire de rassembler tous les travaux relatifs à la structure générale du SNC des Insectes. Il faut souligner que les connaissances n'ont pas énormément progressé depuis les études relativement anciennes de CAJAL et SANCHEZ (1915) ou ZAWARZIN (1924, a et b). Il suffit de rappeler que le SNC des Insectes consiste en une chaîne de ganglions étalés le plus souvent sur toute la longueur de l'animal, et reliés entre eux au moyen de connectifs, l'ensemble étant limité par une gaine nerveuse. Il faut également signaler que le nombre de ganglions (surtout pour les ganglions abdominaux) et leurs dimensions varient considérablement selon l'espèce d'Insecte et le stade de son développement . Chaque ganglion peut être considéré comme un macroélément du SNC dont l'organisation structurale révèle trois zones principales : la gaine nerveuse, les corps cellulaires et le neuropile .

A - LA GAINE NERVEUSE

Selon la terminologie utilisée par SMITH et TREHERNE (1963), le système nerveux est entouré par une gaine comprenant une double couche, la première, plus interne, de nature cellulaire est appelée " périneurium " et la seconde , externe, est la " lamelle neurale " (fig. 1)

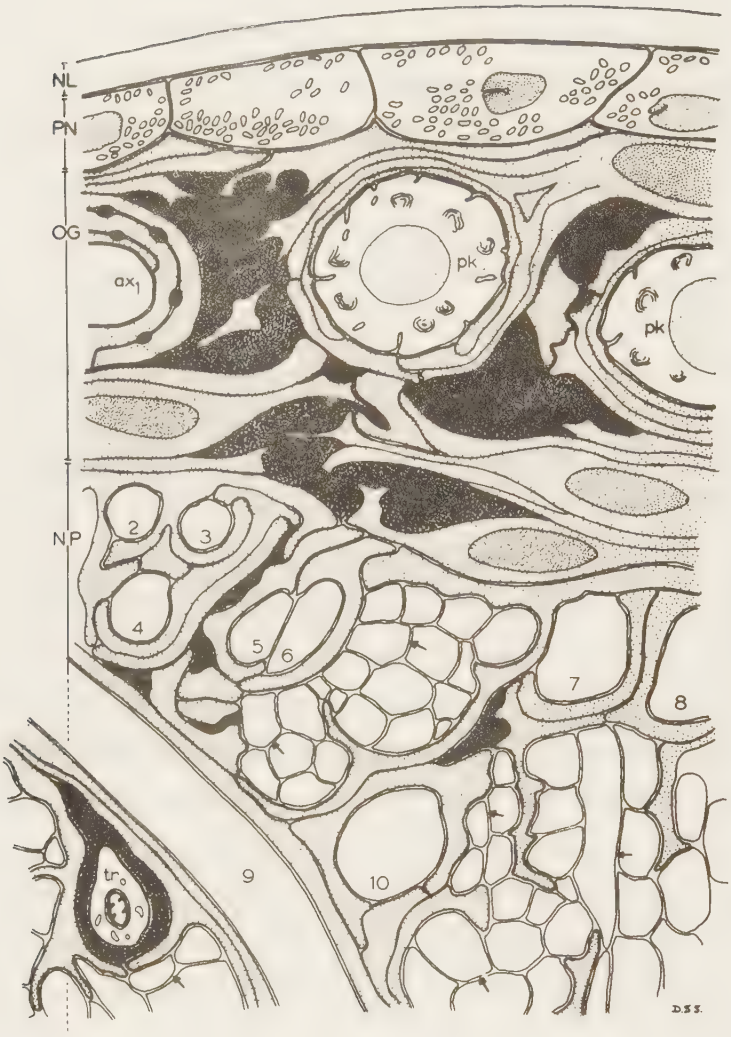


Fig. 1 - Diagramme illustrant les relations entre les compartiments cellulaires et extracellulaires dans le ganglion A_6 de *Periplaneta americana*. La gaine ganglionnaire est représentée par la lamelle neurale externe (NL) et le périneurium (PN). La couche périphérique (OG) contient les péricaryons (pK) ou corps cellulaires et des axones (ax_1) encapsulés par des processus cellulaires de nature gliale (dont le cytoplasme est représenté par le pointillé léger). Le neuropile (NP) constitue la région synaptique du ganglion et contient à la fois des éléments nerveux et gliaux. On y rencontre de nombreux profils axoniques (notés par exemple de 2 à 10) enveloppés seuls ou en groupes par des prolongements gliaux. Certains axones sont parfois étroitement apposés et présentent alors un espace extracellulaire de 100 à 150 Å (flèches). De place en place , on peut observer des espaces extracellulaires relativement larges (ils sont exagérés dans la figure et représentés en pointillés denses). tr= trachéole . D'après Smith et Treherne (1963).

C'est WIGGLESWORTH (1959 b - 1960 a) qui le premier , a précisé le rôle important du périneurium dans le métabolisme du système nerveux, en particulier en posant l'hypothèse que cette couche pouvait être le lieu d'échange de tous les produits nutritifs et excrétés, ainsi que de diverses substances neurosécrétées. De par sa structure collagénique, la lamelle neurale, en plus d'un rôle probable de soutien, influerait sur la composition ionique du milieu en contact avec le périneurium sous-jacent ; là elle pourrait être déjà très différente de celle de l'hémolymphe (SMITH et TREHERNE, 1963).

Cette gaine a souvent été décrite comme une barrière à perméabilité sélective, isolant le milieu qui entoure directement les cellules nerveuses (milieu extracellulaire) de celui de l'hémolymphe. Elle doit en effet assurer un fonctionnement normal des cellules nerveuses dans un environnement (hémolymphe) dont la composition peut varier avec l'alimentation. Des travaux actuellement en cours doivent nous permettre de mieux comprendre comment elle peut assumer ce rôle (TUCKER et PICHON, 1972 ; PICHON et TREHERNE, 1972).

B - LES CORPS CELLULAIRES .

Sous cette gaine se situent l'ensemble des corps cellulaires des motoneurones, des interneurones, des cellules neurosécrétrices et du complexe glial (fig.1) .

D'une manière générale,il n'existe pas de contacts axo-somatiques chez les Insectes et même chez les Arthropodes (voire les Invertébrés) . Cependant,LEGHISSA (1942) a décrit ce type de contact chez *Carausius morosus* . Il pourrait par contre exister des contacts soma-somatiques tels que ceux décrits dans les corps pédonculés de *Formica lugubris Zett.* (LANDOLT et RIS, 1966). Ils se font au niveau d'interruptions de la mince couche gliale (" fenêtres gliales ") qui enveloppe les cellules des corps pédonculés . Ces auteurs ont même avancé que ces contacts pouvaient avoir des propriétés dynamiques sur la régulation du transfert d'information nerveuse. Ces faits, mis en évidence par le microscope électronique, nécessiteraient néanmoins une confirmation d'ordre physiologique .

Le complexe glial a été en particulier décrit dans le ganglion A_6 de *Periplaneta americana* par WIGGLESWORTH (1960 a). Cet auteur y a distingué deux systèmes assez mal séparés: une couche de cellules gliales périphériques dont les prolongements s'insinuent entre les somas neuroniques et une couche plus interne qui envoie un système complexe de processus vers le neuropile. Ces couches et les cellules qui les composent sont souvent partiellement séparées par un système irrégulier de sinus " le système lacunaire glial " (WIGGLESWORTH, 1960 a ; SMITH et TREHERNE, 1963).

C - LE NEUROPILE .

On donne le nom de neuropile au complexe central ganglionnaire où se concentrent les prolongements axoniques et les arborisations de toutes les catégories de neurones. C'est là que se situent en particulier les contacts synaptiques entre les terminaisons axoniques en provenance des neurones bipolaires de nature sensorielle (dont les corps cellulaires sont situés près des récepteurs périphériques) et les autres catégories de cellules nerveuses (interneurones et motoneurones généralement monopolaires) dont les corps cellulaires sont situés à la périphérie des ganglions (1).

Lorsqu'il est observé au microscope optique, le neuropile paraît extrêmement dense et touffu, par suite de la petite taille des éléments qui le constituent. Son étude détaillée s'est donc avérée extrêmement difficile. Cependant, grâce à la technique des imprégnations à l'argent et à l'osmium éthyl-gallate, WIGGLESWORTH (1957, 1959 a et b, 1960 a et b) en dévoila, chez *Rhodnius prolixus* et *Periplaneta americana* , les principaux traits caractéristiques, à la limite de résolution du microscope optique.

En fait, son étude a surtout progressé avec l'utilisation du microscope électronique (voir SMITH, 1967). Les données accumulées depuis 1958 sont déjà nombreuses et celles qui concernent de près la transmission

(1) Chez *Carausius morosus* (HUDDART, 1971) et *Sarcophaga bullata* (CHIARODO, 1968), il y aurait également des cellules bipolaires dans la couche corticale ganglionnaire, dont la signification physiologique est inconnue.

synaptique ont été regroupées dans le tableau I.

On peut noter dans ce tableau que les recherches ont particulièrement porté sur le ganglion A_6 de *Periplaneta americana* (HESS , 1958 a : SMITH et TREHERNE , 1963) et même plus précisément sur le système " fibres cercales - fibres géantes " (FARLEY et MILBURN, 1969). Des zones que l'on peut qualifier " d'unités morphologiques synaptiques " selon l'expression de PALAY (1958), y sont observées (fig. 2). Il existe dans

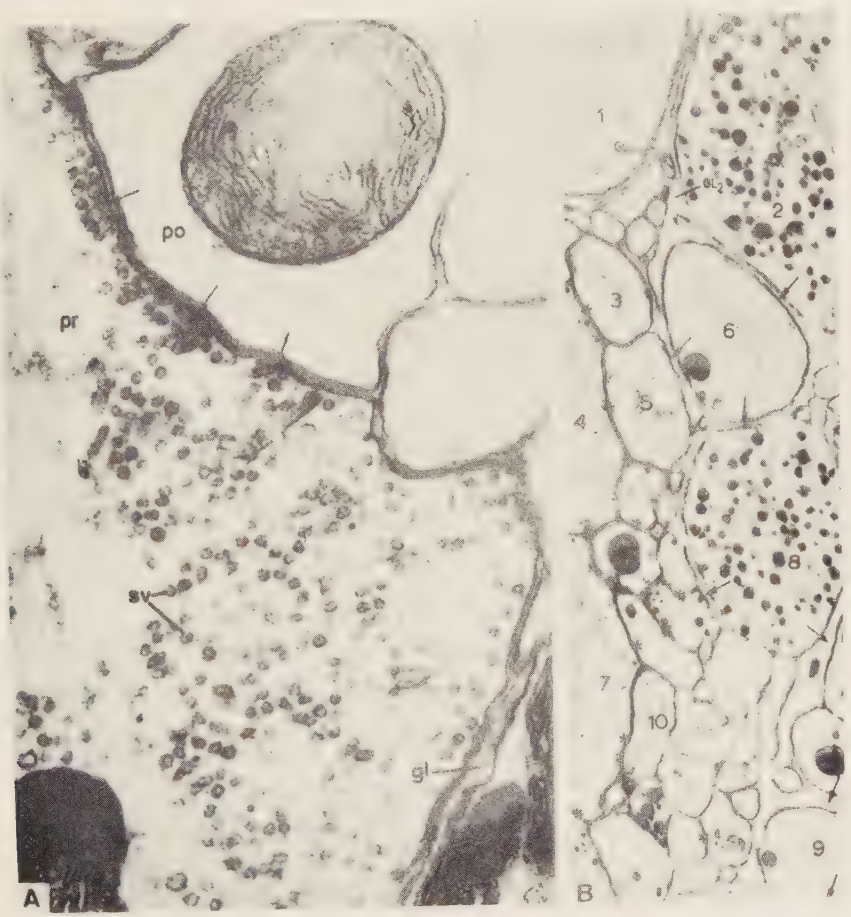


Fig. 2 - Microphotographies électroniques dans le neuropile du ganglion A_6 de *Periplaneta americana* .
A représente une " unité synaptique ", qui pourrait être fonctionnelle. Le cytoplasme de l'élément supposé présynaptique (pr) contient un grand nombre de vésicules synaptiques (sv) qui sont absentes de l'élément supposé postsynaptique (po).
Les vésicules synaptiques se regroupent en grappes aux endroits marqués d'une flèche, zones qui manifestent également une plus grande densité cytoplasmique et membranaire, notamment dans l'élément postsynaptique.
Des processus gliaux (gl), présents partout ailleurs, sont absents de l'espace intersynaptique. x 46.000.
B illustre l'extension des arborisations fines du système glial. Elles s'insinuent distinctement (GL_1, GL_2) entre les axones 1 et 2, moins nettement aux endroits marqués d'une flèche, ou sont même totalement absentes (astérisques). Cette photographie montre également des gouttelettes vraisemblablement de nature neurosécrétrice (axones 2 et 8), des neurofilaments (axones 1, 3, 5, 6 et 9) ou de nombreuses vésicules synaptiques (axones 4, 7 et 10).
D'après Smith et Treherne, 1963. x 17500 .

ce cas, deux profils axoniques dont les membranes sont espacées par 200 Å environ. Le premier axone contient des grappes espacées de vésicules synaptiques de 300 à 500 Å de diamètre concentrées le long de la membrane de l'axone qualifié dès lors de présynaptique. Les deux membranes en regard de ces grappes sont d'une densité électronique plus grande. Le deuxième axone est dépourvu de vésicules et serait alors postsynaptique . L'ensemble pourrait fonctionner selon le schéma classique rappelé dans l'introduction. Outre les vésicules, on peut observer la présence de mitochondries et de neurotubules. Ces derniers éléments viennent de faire l'objet d'une étude récente (LANE et TREHERNE, 1970) portant sur la chaîne abdominale de la Blatte. L'examen du tableau I révèle aussi que des vésicules d'un diamètre plus élevé (800 à 1100 Å) sont souvent également présentes dans certains profils axoniques, ainsi que des gouttelettes de neurosécrétion (1200-2500 Å).

Plusieurs auteurs signalent la présence en grand nombre de jonctions serrées (" tight junctions ") . Dans ce cas, les membranes nerveuses en regard sont fusionnées et donnent des contacts sans espace extracellulaire ce qui permet d'envisager l'existence d'une réelle transmission électrique. Cette question mériterait une étude plus approfondie car il n'est guère exclu que ce type de transmission puisse jouer un rôle non négligeable dans les ganglions d'Insectes.

En conclusion,nous pouvons dire qu'il n'existe pas de différences fondamentales entre les éléments ultrastructuraux rencontrés chez les Insectes et les autres groupes d'animaux, en particulier les Vertébrés. En fait, les différences les plus frappantes portent sur l'organisation spatiale et les relations entre les neurones à l'intérieur des ganglions.

TABLEAU I

Données structurales et ultrastructurales neuropilaires dans le SNC des Insectes

Ordres et espèces	Tissu nerveux	Age et sexe	Contacts synaptiques				Vésicules (Å)			Espaces synaptiques (Å)	Neuro-tubules (Å)	Auteurs
			en boutons	longi-tudinaux	en croix	jonctions serrées	synap-tiques	gouttelettes de sécrétion	autres vésicules			
ODONATES												
Calopteryx splendens	Ggs cérébroïdes	L.					250-300			100		BUCHHOLTZ, 1964
DICTYOPTERES												
Periplaneta americana	Ganglion A_6	Ad.	+	+	+		300-500	1200-2500	1000-1500	+		HESS, 1958 a
	"			+	+		300-500	800-1100		100-200	100-150	SMITH & TREHERNE, 1963; SMITH, 1965
	"						500	800-1500				MILBURN, 1968
	(f.cercales+f.géantes)	Ad.					450-550	1000-1300	900-1100	200		FARLEY & MILBURN, 1969
	Deutocérébron						300-600			150-200		BOECKH, SANDRI & AKERT, 1970
	Corps pédonculés	Ad.♀					200-400		300-1100			MANCINI & FRONTALI, 1967
	Corps pédonculés	Ad.♀					400-600		600-1100	100-200	+	FRONTALI & MANCINI, 1970
ORTHOPTERES												
Acheta domesticus	Corps pédonculés	Ad.					200-400		600-1200			SCHÜRMANN, 1970
CHELEUTOPTERES												
Carausius morosus	Gg. prothoracique	Ad.	+	+	+	+	+	+	+		200-250	HUDDART, 1971
COLEOPTERES												
Tenebrio molitor	3ème gg. abdominal	L.	+	+	+		300-400	1200-1500	500-700 850-2000 1000-5000	100-200	260	CHIARODO, KISSEL & MACKELL, 1970
DIPTERES												
Calliphora vicina	Deutocérébron						300-600			150-200		BOECKH, SANDRI & AKERT, 1970
Sarcophaga bullata	Ggs thoraciques	Ad.	+	+	+		300-500	800-1200		100	200	CHIARODO, 1968
	Chaîne ventrale	L.	+	+	+		300-400	1200-1500	500-700	100-200	260	CHIARODO, KISSEL & MACKELL, 1970
Phormia terrae-novae	Système nerveux	L.		+	+	+	300-600	1000-1500		150-200	+	OSBORNE, 1966
LEPIDOPTERES												
Pholus labruscoe	Chaîne nerveuse		+	+	+		200	600				TRUJILLO - CENOZ, 1959
Hylesia nigricans	Chaîne ventrale		+	+	+		250-500					TRUJILLO - CENOZ, 1962
Automeris coroesus	Chaîne ventrale		+	+	+		250-500					TRUJILLO - CENOZ, 1962
Ecpantheria indecisa	Chaîne ventrale		+	+	+		250-500					TRUJILLO - CENOZ, 1962
HYMENOPTERES												
Formica lugubris Zett.	Corps pédonculés		+				300-600		700-1000	130		LANDOLT & SANDRI, 1966
	Corps pédonculés		+			+	300-600	1000-1500		150-200	200	STEIGER, 1967
	Corps péd.& gg. proth.	Ad.					300-600	1000-2000				LAMPARTER & Coll., 1969
Camponotus ligniperdus	Corps pédonculés		+			+	300-600	1000-1500		150-200	200	STEIGER, 1967
Apis mellifica L.	Corps pédonculés	Ad.			+		350-600		500-1000	70		SCHÜRMANN, 1971

Chapitre II

Données électrophysiologiques.

A - ENREGISTREMENT PAR ELECTRODES EXTERNES.

Cette technique a essentiellement été employée dans deux séries expérimentales différentes; d'une part, pour localiser les trajets nerveux et les connexions synaptiques liés à des comportements donnés (réflexe de fuite, respiration, vol ....); d'autre part , pour tester diverses substances pharmacologiques, notamment les insecticides et plus rarement, certaines substances candidates-médiateurs chimiques. Nous laisserons momentanément de côté les données pharmacologiques que nous regrouperons séparément dans le paragraphe suivant et nous ne nous intéresserons qu'aux données acquises au niveau du ganglion A_6 de *Periplaneta americana* .

Dès 1937, PUMPHREY et RAWDON - SMITH , démontrent que la plupart des fibres afférentes cercales font relais au niveau du ganglion A_6 sur un ensemble de fibres qu'ils qualifièrent de " géantes ". Ils montrent en outre que ces fibres peuvent être activées par la stimulation mécanique ou " vibratoire " de mécanorécepteurs situés sur des appendices caudaux segmentés appelés " cerques ". Ils mettent en évidence la nécessité d'une certaine sommation pour activer les fibres géantes, et la fatigabilité de ces synapses à des fréquences relativement faibles (25/s). La réponse post-ganglionnaire peut être modifiée par le recrutement d'un nombre plus grand de fibres préganglionnaires (par accroissement de l'intensité de stimulation), par augmentation de la fréquence de stimulation (sans variation de son intensité) ou par " interposition " d'un extrastimulus dans une série stimulante donnée, (phénomène qualifié de " déshabituation " par les auteurs modernes).

ROEDER,en 1948 (a)reprend la même préparation,et par l'utilisation de brefs jets d'air comme stimuli, dégage les principaux trajets fonctionnels et les connexions centrales impliqués dans le réflexe de fuite. Il précise en particulier que les fibres géantes remontent sans interruption toute la chaîne nerveuse abdominale et pense qu'elles s'articuleraient au niveau des ganglions thoraciques sur les motoneurones commandant les organes locomoteurs.

ROEDER, KENNEDY et SAMSON (1947) montrent que le délai synaptique varie entre 0,7 et 2 ms au niveau du ganglion A_6.

YAMASAKI et NARAHASHI, en 1960, toujours au niveau du même ganglion, portent leur attention sur les phénomènes électriques associés à la transmission synaptique et plus particulièrement sur la recherche du médiateur. En plaçant les électrodes d'enregistrement aussi près que possible du ganglion, c'est-à-dire à l'origine des connectifs, ils dérivent un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE) associé à une stimulation présynaptique cercale. Pour une stimulation suffisamment forte peuvent se greffer, au seuil, des potentiels d'action correspondant en partie à l'action des fibres géantes. Ce PPSE a un temps de montée de 2 à 3 ms et décroît de façon exponentielle avec une constante de temps de 5 à 20 ms. Il est précédé par un petit potentiel d'action considéré comme le potentiel présynaptique transmis électrotoniquement le long du ganglion. Dans ces conditions,le délai synaptique peut être mesuré entre le petit potentiel d'action électrotonique et le début du PPSE , avec davantage de précisions que n'a pu le faire ROEDER. Après soustraction du délai de conduction le long du nerf cercal jusqu'à l'entrée du ganglion (vitesse de conduction 1,5 à 2 m/s (ROEDER, 1948 a) sur 200µm soit 0,1 ms), la moyenne du délai synaptique s'élève à 1,59 ms et s'établit entre 0,97 et 2,08 ms. Un autre PPSE ayant un délai plus long (30 à 50 ms) peut également être enregistré et représente pour YAMASAKI et NARAHASHI (1960) une réponse ganglionnaire polysynaptique.

B - ENREGISTREMENT PAR MICROELECTRODES CAPILLAIRES.

Le développement de la microélectrode capillaire a rendu possible l'enregistrement et l'évaluation des potentiels de membrane et d'action à partir d'une très large gamme de tissus excitables. Il était tout naturel que cette technique soit également appliquée au tissu nerveux d'Insecte.

Les premiers essais ont été effectués avec succès par BOISTEL et CORABOEUF en 1954(a) pour l'étude des propriétés électriques des fibres nerveuses géantes de *Periplaneta americana* . Dans cette étude, l'enregistrement se fait entre deux ganglions abdominaux , c'est-à-dire au niveau des connectifs. Elle a été reprise par divers auteurs dont YAMASAKI et NARAHASHI (1959 a) et complétée récemment par PICHON (1969) qui, utilisant en outre la technique du " voltage imposé " , a pu raisonner à l'échelon des courants ioniques.

En dépit de la popularité que possèdent les Insectes pour la recherche comportementale (voir revue par HOYLE, 1970) et neuromusculaire (voir revue par USHERWOOD, 1969), il existe peu d'informations sur l'activité intracellulaire dans le SNC, c'est-à-dire au niveau ganglionnaire. Le travail le plus ancien a été effectué par HAGIWARA et WATANABE (1956) et porte sur l'étude du réflexe " auditif " d'une cigale japonaise , *Graptopsaltria nigrofuscata*. Ils ont opéré par enregistrement intracellulaire dans la région du ganglion où ils pensaient rencontrer le corps cellulaire d'un des deux motoneurones impliqués dans le réflexe. Les valeurs maximum observées sont de 60 mV pour le potentiel de membrane et de 75 mV pour le potentiel d'action. Le potentiel d'action se greffe parfois sur un potentiel plus lent, de 10 à 15 mV d'amplitude pouvant s'apparenter à un PPSE. L'introduction de la microélectrode se fait au hasard et sans repérage ultérieur donnant peu d'indications sur son emplacement exact.

Depuis lors, les travaux, peu nombreux d'ailleurs, se sont concentrés sur 4 espèces d'Insectes et méritent, afin de faire le point, d'être quelque peu détaillés , ils portent sur :

- 2 Dictyoptères : *Periplaneta fuliginosa* : ROWE (1960, 1963 et 1969)
  Periplaneta americana : CALLEC et BOISTEL (1965 a et b; 1966 a et b et 1967); KERKUT, PITMAN et WALKER (1968 et 1969 a et b) ; PITMAN et KERKUT (1970); JEGO, CALLEC, PICHON et BOISTEL (1970); CROSSMAN, KERKUT, PITMAN et WALKER (1971).

- 2 Orthoptères : *Gryllus campestris* : BENTLEY (1969 a et b)
  Schistocerca gregaria :IWASAKI et WILSON(1966); KENDIG (1968); HOYLE (1970); HOYLE et BURROWS (1970).

Ils sont consacrés à la transmission synaptique mais la plupart orientés vers l'étude des mécanismes centraux gouvernant un comportement donné. Ils comportent souvent l'enregistrement intracellulaire de PPSEs et parfois également de PPSIs.

1) Chez *Periplaneta fuliginosa* les enregistrements ont lieu dans des neurones non identifiés du neuropile du ganglion métathoracique. Cinq groupes d'électrodes stimulatrices sont mis en place au niveau des deux tibias métathoraciques, de la chaîne ventrale (entre les ganglions A_4 et A_5) et des connectifs droit et gauche, entre les ganglions pro- et mésothoracique ou entre les ganglions méso- et métathoracique. La chaîne nerveuse est laissée in situ, tout en maintenant le système trachéen aussi intact que possible. Une faible portion de la gaine entourant le ganglion est très délicatement enlevée pour permettre le passage de la microélectrode. Les enregistrements recueillis sur 120 cellules ont rarement été franchement intracellulaires; la plupart d'entre eux sont " quasi intracellulaires " ; c'est-à-dire que la microélectrode, ayant lésé la membrane de la fibre, crée une zone de faible résistance entre l'intérieur et l'extérieur, ce qui permet une certaine liaison, semi-directe, entre la pointe de la microélectrode et l'intérieur de la fibre. Les potentiels ainsi obtenus sont de signe positif et ont des amplitudes s'étalant entre 2 et 30 mV.

ROWE a pu, de cette façon, démontrer la possibilité d'enregistrer des PPSEs de faible amplitude (4mV), de durée voisine de 25 ms, mais seulement dans quelques cas favorables. Il eut également le mérite de montrer, mais seulement dans 3 cas sur 120, la présence de réponses inhibitrices sous forme de légères hyperpolarisations de longue durée (50 ms environ) capables de bloquer une activité " spontanée " de la cellule interrogée.

2) Chez *Gryllus campestris* , BENTLEY a surtout tenté de dégager, par la technique des microélectrodes intracellulaires introduites dans le ganglion mésothoracique, les mécanismes régulateurs centraux de l'activité des motoneurones impliqués dans un comportement donné (réflexe de fuite, rythme ventilatoire, vol (BENTLEY, 1969 a), et chant (BENTLEY, 1969 b). Jusqu'alors, l'étude de ces comportements était restée à l'échelon de la localisation des motoneurones et de leurs rythmes d'activité, c'est - à - dire que

les auteurs ont surtout étudié le " niveau de sortie " de ces systèmes. En se plaçant à un autre niveau, BENTLEY a cherché à préciser d'une part, quelles sont les afférences et leurs effets au niveau des motoneurones eux-mêmes, et d'autre part, quelle est l'activité de ces afférences (qui sont en l'occurrence des interneurones) et le rôle qu'elles peuvent jouer, en particulier dans la régulation centrale. Tous les corps cellulaires, accessibles après incision de la gaine, ont un potentiel de membrane de 50 à 70 mV, mais en aucun cas ils n'ont montré de potentiels synaptiques et d'action. Ils sont reconnaissables à leur grande taille, à leur position à la surface du ganglion, et après coloration.

Dans le neuropile, il est possible d'effectuer des enregistrements souvent " quasi intracellulaires " (potentiels de membrane: 20 à 70 mV et potentiels d'action: 5 à 40 mV) soit au niveau des zones synaptiques des motoneurones, soit dans des interneurones. Lorsque le potentiel de membrane est compris entre 50 et 70 mV, on peut admettre que l'enregistrement est bien intracellulaire. Cependant, dans ce cas, les potentiels d'action n'excèdent jamais 40 mV, ce qui laisse supposer que les zones interrogées ne sont pas envahies par ces potentiels.

BENTLEY enregistre aussi de nombreux PPSEs et PPSIs unitaires dont l'amplitude ne dépasse pas 2 à 3 mV et dont la durée atteint environ 18 ms pour les PPSEs et 25 ms pour les PPSIs (mesures effectuées directement sur les enregistrements de BENTLEY, 1969 a).

Chez le grillon, le réflexe de fuite est mis en jeu par une vibration du substrat ou de l'air. Il est assuré par les récepteurs cercaux, les fibres géantes des connectifs abdominaux et les motoneurones thoraciques (HUBER, 1965). Les résultats de BENTLEY tendent à montrer que, au repos, les motoneurones commandant les appendices locomoteurs sont continuellement inhibés (enregistrement constant de PPSIs). Lorsque les cerques sont stimulés, le bombardement de PPSIs cesse, la cellule se dépolarise et donne des potentiels d'action. Par enregistrements simultanés dans un interneurone et sur le nerf moteur, il a pu montrer qu'il y a une corrélation entre la mise en activité des motoneurones et la cessation d'activité de certains interneurones. La séquence complète typique pourrait se résumer ainsi :
stimulation cercale ⟶ inhibition d'un interneurone inhibiteur à activité rythmique permanente ⟶ levée d'inhibition des motoneurones ⟶ mise en activité de ces motoneurones ⟶ retour à la situation de repos à la fin

de la stimulation cercale .

Ces observations confirment la théorie selon laquelle une inhibition sélective joue un rôle important dans le contrôle des comportements chez les Insectes.

Il est probable, d'après BENTLEY, que,au cours de la levée d'inhibition, les motoneurones sont en même temps activés par les fibres géantes ou certaines afférences et modulés (adaptation de leur rythme) par des messages sensoriels venant des pattes.

Des PPSIs ont également été enregistrés dans des motoneurones impliqués dans la ventilation (BENTLEY, 1969 a). Cette phase inhibitrice est, comme dans le réflexe de fuite, en liaison avec des interneurones inhibiteurs. Ces deux comportements pourraient donc être déclenchés et régulés par des mécanismes nerveux fondamentalement très proches l'un de l'autre .

Toujours par cette même méthode, BENTLEY a pu montrer que, dans le cas du vol, l'inhibition joue un rôle dans l'élaboration des rythmes d'activité. Le vol s'accompagne d'une dépolarisation stable génératrice d'influx dans les motoneurones des muscles élévateurs; cette activité est interrompue à la mise en jeu des motoneurones innervant les muscles dépresseurs. La fin de chaque dépolarisation s'accompagne d'un brusque retour à la ligne de base suggérant (d'après BENTLEY) plutôt l'intervention d'une afférence inhibitrice qu'une simple cessation d'excitation. Nous ajouterons, sans entrer dans les détails, que cette méthode a été également appliquée avec succès pour l'étude du chant chez le grillon (BENTLEY, 1969 b) . L'activité des motoneurones est là aussi soumise à l'alternance d'activités excitatrices (PPSEs) et inhibitrices (PPSIs) dues à un réseau d'interneurones.

3) Quelques tentatives ont été faites chez *Schistocerca gregaria*

IWASAKI et WILSON (1966) et KENDIG (1968) ont étudié le contrôle central du vol.

Les premiers auteurs enregistrent,dans certains interneurones du ganglion mésothoracique,des réponses postsynaptiques (PPSEs) en relation avec la stimulation des nerfs sensoriels alaires. Leurs réponses sont cependant de type "quasi intracellulaire" et peuvent être interprétées comme la mise en évidence d'un réseau interneuronique impliqué dans le contrôle moteur du vol.

Les études de KENDIG (1968) sont tout à fait comparables,mais ont été effectuées au niveau des motoneurones eux-mêmes, non pas dans le corps cellulaire, mais dans des zones plus ou moins proches des contacts synaptiques. Elle enregistre ainsi des PPSEs plus ou moins amples et des potentiels d'action de l'ordre de 50 à 60 mV.

Plus prometteuses sont les études menées actuellement par HOYLE et BURROWS (1970) et citées par HOYLE (1970). Ces auteurs enregistrent l'activité de motoneurones ou d'interneurones du ganglion métathoracique de *Schistocerca gregaria* . Les motoneurones sont identifiés par contrôle sur le muscle innervé. Chaque corps cellulaire est ensuite marqué par l'injection électrophorétique d'un colorant (jaune procion), ce qui assure son repérage exact. Des coupes sériées pratiquées dans le ganglion permettent enfin une reconstitution tridimentionnelle. Les neurones ont presque exactement la même position d'un ganglion à l'autre et d'un côté à l'autre dans un même ganglion. Tous les corps cellulaires ainsi reconnus se sont avérés inexcitables,mais peuvent être envahis électrotoniquement par le potentiel d'action dont l'amplitude oscille entre 3 et 25 mV, tandis que le potentiel de membrane atteint 50 à 56 mV. Des PPSEs et des PPSIs de différentes tailles ont pu être enregistrés dans le soma des moto-et des interneurones.

4) Expériences chez *Periplaneta americana*

Au début de ce chapitre, nous avons montré l'intérêt déjà suscité par le ganglion A_6 et en particulier par l'étude de la transmission synaptique entre les fibres sensitives d'origine cercale et le système d'interneurones géants. Ces fibres géantes, dont le diamètre peut atteindre 50 µm se prolongent dans le ganglion jusqu'au tiers postérieur (ROEDER, 1948 a).Nous aurons l'occasion de revenir plus en détail sur l'étude anatomique de ce système. Ces caractéristiques permettent d'envisager l'utilisation de microélectrodes, en position intracellulaire, aussi près que possible des sites synaptiques. La nécessité de pénétrer dans le neuropile est renforcée par l'ignorance totale que nous avons, quant à la position précise des corps cellulaires appartenant à ces fibres et donc évidemment de leur taille . L'étude histologique du ganglion A_6 a d'ailleurs montré que, d'une manière générale, le diamètre des corps cellulaires est relativement petit. Il atteint en moyenne 10 à 30 µm et exceptionnellement 20 à 40 µm pour certains corps cellulaires médio-dorsaux.

Nous allons développer l'essentiel des résultats que nous avons pu acquérir grâce à l'emploi de la microélectrode capillaire introduite, soit dans certains corps cellulaires périphériques, soit dans le neuropile.

a) Techniques utilisées.

La préparation comprenant, les cerques, les nerfs cercaux, le ganglion A_6 et la chaîne ventrale abdominale jusqu'au ganglion métathoracique inclus est isolée et placée le plus rapidement possible dans une cuve en plexiglas contenant du liquide physiologique (selon la composition préconisée par YAMASAKI et NARAHASHI, 1959 a) modérément oxygéné. Le réseau trachéen est conservé aussi intact que possible ce qui permet à la préparation de se maintenir en bon état pendant une dizaine d'heures et à la transmission synaptique d'être assurée dans les meilleures conditions. La gaine du ganglion ne peut pas être traversée par la microélectrode sans que celle-ci s'en trouve endommagée. L'emploi d'enzymes protéolytiques en vue de la ramollir n'a pas abouti à des résultats satisfaisants. Elle doit donc être préalablement incisée; cette opération est effectuée avec de très grandes précautions à l'aide de deux paires de brucelles aux pointes aussi affinées que possible et travaillant simultanément, d'abord dans le sens longitudinal puis transversal. Le dispositif expérimental permet de stimuler, à l'aide de très fins crochets d'argent chloruré, différents nerfs ou connectifs plongés dans le liquide physiologique.

Les résultats dépendent étroitement de la qualité des microélectrodes utilisées. Ils ont été grandement améliorés par des microélectrodes capillaires aussi fines que possible. Des contrôles au microscope électronique ont montré qu'elles avaient dans ce cas un diamètre avoisinant 0,1 µm (BOISSEAU et BOISTEL, 1965). Elles sont remplies de KCl-3M ou d'un colorant lorsque le repérage est souhaité, et leur résistance électrique est comprise entre 20 et 30 M Ω. . De très grandes précautions doivent être prises au moment du remplissage, afin d'éviter toute vibration qui aurait pour conséquence de briser l'extrême pointe. Des électrodes moins fines (0,5 à 1 µm) ont quelquefois été utilisées: remplies de NaCl-4M, elles sont utilisées en position extracellulaire et permettent, dans un premier temps, de situer approximativement les zones synaptiques et de les prospecter.

Une localisation de la pointe de la microélectrode est indispensable afin de déterminer avec précision la cellule interrogée. Nous avons successivement utilisé deux méthodes, toutes deux basées sur le même principe, c'est-à-dire sur l'injection électrophorétique d'un produit ionisable en solution.

1° - La microélectrode est remplie de ferrocyanure de potassium ($Fe(CN)_6K_4$) suivant la technique développée par BULTITUDE (1958) chez les Vertébrés. Son injection ionophorétique développe la formation de bleu de prusse par addition de chlorure ferrique ($FeCl_3$) dans le bain, à la fin de l'expérience (CALLEC et BOISTEL, 1965 b).

2° - L'injection de bleu de méthyle (suivant la technique de THOMAS et WILSON, 1966) a été préférée à la première car elle est plus aisée à réaliser. La coloration est immédiate et parfois visible in situ lorsqu'il s'agit des corps cellulaires (CALLEC et BOISTEL, 1966 a).

Le contrôle histologique ultérieur sur coupes sériées permet de localiser avec une très bonne précision (points colorés d'un diamètre atteignant une dizaine de microns, et même parfois moins) la position de la pointe de la microélectrode, notamment dans le neuropile. L'introduction de la microélectrode se fait en général par la face dorsale à l'aide d'un micromanipulateur permettant de progresser micron par micron.

Au cours de la progression au sein du neuropile, il est indispensable de contrôler fréquemment la résistance de la microélectrode, signe indicateur de son état, et d'opérer de fréquents retours en arrière lorsqu'elle a tendance à se boucher. L'approche d'une fibre d'un certain diamètre se signale fréquemment par l'enregistrement d'une volée de potentiels d'action de faible amplitude (quelques mV), de signe positif (ce qui dénote un certain contact électrique avec l'intérieur de la fibre) ou parfois négatif (potentiels extracellulaires). Ces derniers potentiels s'inversent dès que la pointe de la microélectrode a perforé ou partiellement lésé la membrane. La pénétration en position franchement intracellulaire s'accompagne d'une augmentation progressive de l'amplitude des potentiels d'action et du potentiel de membrane. Elle est grandement facilitée par l'application de très légers tapotements sur le support à électrodes, ou même sur la table. L'endroit choisi pour le tapotement doit être fonction du sens de déplacement vibratoire appliqué à

la microélectrode (de préférence vertical) et de son amplitude (le moins ample possible). Cette façon de procéder permet la plupart du temps une pénétration en deux temps: d'abord plus ou moins brutale (potentiel de membrane atteignant 40 à 50 mV), puis très lente et progressive, sans aucune intervention extérieure. Les potentiels d'action dus à la lésion initiale deviennent , tout en grandissant, de moins en moins nombreux , tandis que le potentiel de membrane augmente, également très progressivement, jusqu'à une valeur de l'ordre de 75 mV. Tout se passe comme si, après la blessure initiale infligée à la membrane, celle-ci se cicatrise autour de la pointe de la microélectrode, éliminant ainsi lentement tout court-circuit électrique entre l'intérieur et l'extérieur (opération qui dure 15 à 20 mn).

b) Résultats

α- Activités ganglionnaires périphériques (CALLEC et BOISTEL , 1966a)

Lorsque la préparation est en place dans la cuve à expérimentation, aucune structure périphérique (sinon parfois certains corps cellulaires médio-dorsaux) n'est visible sous contrôle optique; aussi la microélectrode est-elle introduite au hasard après incision de la gaine. Dans certains cas, elle pénètre franchement dans des structures totalement inexcitables et dont le potentiel de membrane est très ample (80 à 95 mV). Il peut s'agir de cellules gliales. Plus fréquemment, la microélectrode rencontre des axones répondant par une activité de lésion sous la forme de potentiels d'action de quelques mV, activité qui peut durer quelques dizaines de secondes. Ces axones sont fins et peuvent être difficilement pénétrés en position franchement intracellulaire.

Dans la région médio-dorsale du ganglion, nous avons localisé , s'étendant sur 200 µm environ, une région de corps cellulaires de 20 à 40 µm de diamètre,qu'il est possible d'interroger par la microélectrode, en position intracellulaire. Ils sont autoactifs dans 30 à 40 % des cas et présentent un potentiel de membrane de 50 à 80 mV. Lorsqu'ils sont préalablement silencieux, ils peuvent être activés par une dépolarisation artificielle de leur membrane. Les potentiels d'action sont amples (90 à 120 mV) et se

succèdent à fréquence régulière faible (fig. 3). Chaque potentiel est précédé par une phase de dépolarisation très lente (120 ms) et suivi d'un potentiel consécutif positif important (18 à 20 mV) tandis que la phase rapide dure 2 à 3 ms (fig. 3, B). Nous avons montré, par marquage au bleu de méthyle, que cette activité provient incontestablement de corps cellulaires dont un exemple est montré dans la fig. 11 D.

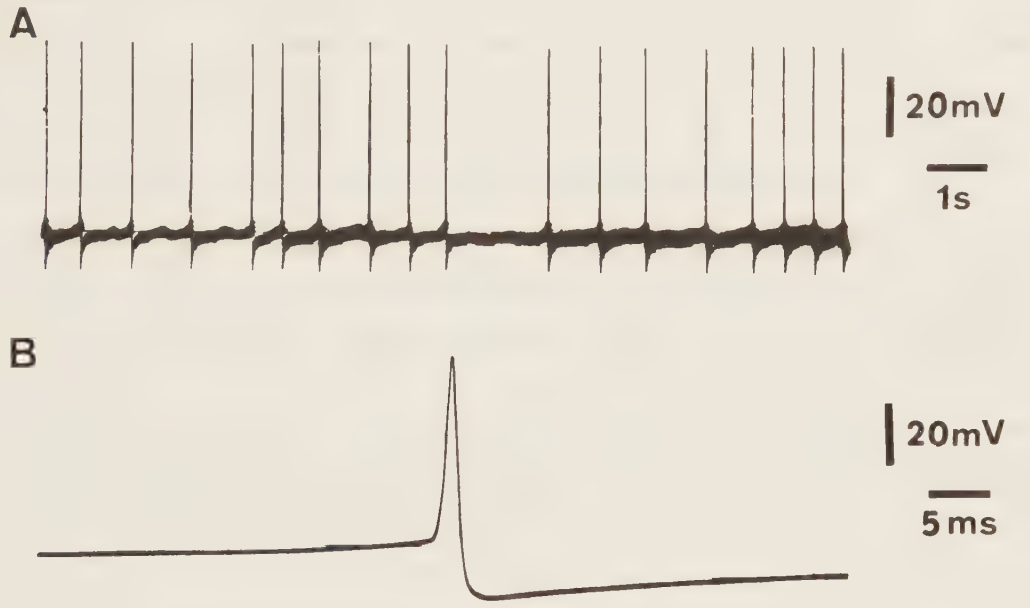


Fig. 3 - Exemples de potentiels d'action enregistrés dans certains corps cellulaires médio-dorsaux du ganglion A_6. Noter la qualité autoactive de ces cellules (A) et l'importance du potentiel consécutif positif (B).

Ils ne sont pas sphériques mais allongés en forme de poire et le prolongement axonique s'enfonce d'abord verticalement dans le neuropile (1). Aucun des corps cellulaires étudiés n'a pu être stimulé par voie antidromique, ce qui leur conférerait la qualité d'interneurones intraganglionnaires dont le rôle est pour l'instant encore inconnu. Leur intérêt est actuellement limité au fait qu'ils représentent le premier exemple d'activité somatique incontestablement rencontrée chez les Insectes.

(1) La géométrie de ces corps cellulaires vient tout récemment d'être entreprise par CROSSMAN, KERKUT, PITMAN et WALKER (1971) grâce à l'injection de jaune procion. Ils ont montré que l'axone, après un trajet vertical, se divise en deux branches symétriques qui suivent la courbure du neuropile à sa limite extérieure, d'abord transversalement puis postérieurement. Dans un seul cas, ils ont pu suivre un prolongement axonique extra-ganglionnaire, dans un des nerfs cercaux.

Récemment, JEGO, CALLEC, PICHON et BOISTEL (1970) en ont précisé leurs caractéristiques électriques et ioniques essentielles. Ces mêmes corps cellulaires ont d'ailleurs été repris par KERKUT, PITMAN et WALKER (1968 et 1969 a et b), PITMAN et KERKUT (1970), essentiellement pour l'étude des propriétés de leur membrane vis-à-vis de l'acétylcholine et de l'acide γ-aminobutyrique .

Les principaux résultats dégagés par ces auteurs seront repris plus loin dans la discussion des divers chapitres correspondants.

β- Activités synaptiques neuropilaires (CALLEC et BOISTEL, 1966 a et b et observations non publiées).

Dans la zone centrale du neuropile, la probabilité pour que la microélectrode pénètre dans une fibre postsynaptique (en particulier dans les fibres géantes), et cela dans le voisinage immédiat des contacts synaptiques, est assez élevée. Cependant, nous sommes obligés de procéder par tâtonnements, ce qui rend délicat l'approche de fibres géantes dont le diamètre est, à ce niveau, relativement faible (10 µm ou même moins). En outre, l'identification des fibres interrogées est difficile, voire impossible à envisager d'une manière routinière. En observant certaines précautions (qualité de la microélectrode, progression très lente dans le ganglion), nous avons pu améliorer considérablement les résultats et assurer assez fréquemment des enregistrements en position franchement intracellulaire pendant un temps suffisamment long pouvant varier de une demi-heure à une heure pour des fibres de petit diamètre, jusqu'à deux heures dans les fibres " géantes "

Selon la région où se situe l'empalement, on peut classer les enregistrements en deux catégories :

1° - Enregistrements situés approximativement au tiers postérieur du ganglion :

La microélectrode pénètre et se maintient relativement aisément en position intracellulaire dans une zone qui, d'après des expériences de marquage, se situerait au point de convergence des branches dendritiques, au niveau du segment que nous avons appelé plus loin, "segment intégrateur". Nous pensons qu'il s'agit d'une portion de fibre géante . Le potentiel de membrane y est toujours faible (45 à 55 mV). La pénétration

de la microélectrode n'est, dans cette région, jamais accompagnée par une activité de lésion. Nous y observons par contre, fréquemment, une activité de base constituée de petites ondes de dépolarisation ou d'hyperpolarisation dont la forme rappelle (fig.4) respectivement celle de PPSEs et PPSIs unitaires rencontrés dans d'autres préparations. (voir références p. 135).

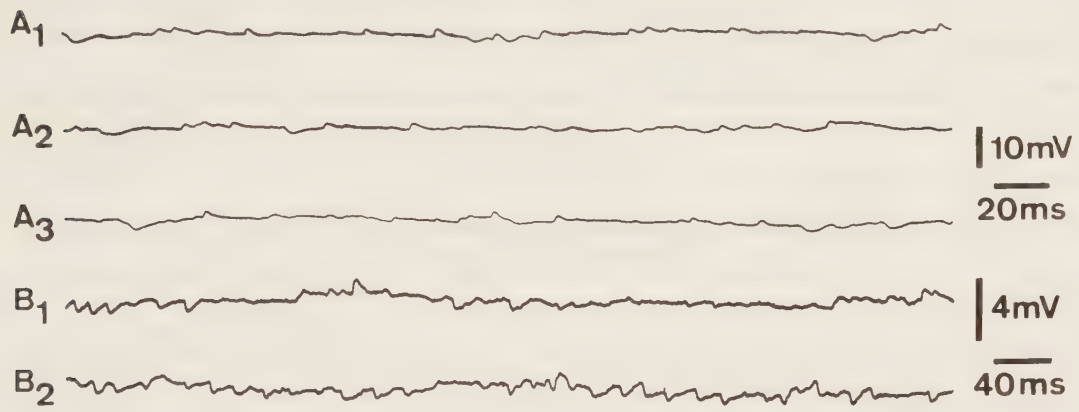


Fig. 4 - Deux exemples (A et B) d'activité de base composée de PPSEs et de PPSIs unitaires enregistrés par microélectrode intracellulaire dans le neuropile du ganglion A_6. Ces potentiels sont enregistrés dans la région du segment intégrateur inexcitable d'une fibre géante. A: potentiel de membrane = 55 mV.
B: potentiel de membrane = 50 mV.

Leurs principales caractéristiques sont rassemblées dans le tableau II.

Tableau II

	PPSEs unitaires	PPSIs unitaires
Amplitude	0,7 - 2,3 mV	0,5 - 2 mV
Temps de montée	0,9 - 1,3 ms	2,7 - 3,3 ms
Durée totale	5 - 10 ms	9 - 18 ms

La technique utilisée rend difficile une étude approfondie de ces divers potentiels (origine, nature exacte, signification biologique ....); aussi

aurons-nous l'occasion d'y revenir plus loin après les avoir étudiés par la technique de la " fibre isolée " (voir p. 118).

La stimulation électrique croissante des nerfs cercaux X et XI détermine un potentiel postsynaptique biphasique dont les deux composantes , dépolarisante et hyperpolarisante , augmentent progressivement en amplitude (un exemple en est donné dans les figures 5 et 7). La phase dépolarisante peut atteindre une grande amplitude (25 mV) sans que soit nettement discernable la présence d'un potentiel d'action. Dans certaines conditions, par exemple à la suite d'un choc hyperpolarisant, il est possible d'enregistrer des potentiels d'action qui n'excèdent pas une trentaine de mV (fig. 5, photos n°7 et 8) alors que les PPSEs et les PPSIs unitaires ont toujours une amplitude relativement grande. Il est donc vraisemblable que cette zone est électriquement inexcitable et que les petits potentiels d'action sont conduits électrotoniquement à partir d'une région active du neurone. La phase hyperpolarisante atteint 10 mV.

Le déplacement artificiel du potentiel de membrane par un courant permet d'observer une variation de l'amplitude des deux composantes. Pour des chocs hyperpolarisants, la composante dépolarisante s'accroît tandis que la composante hyperpolarisante diminue et tend à s'inverser (fig. 5) .

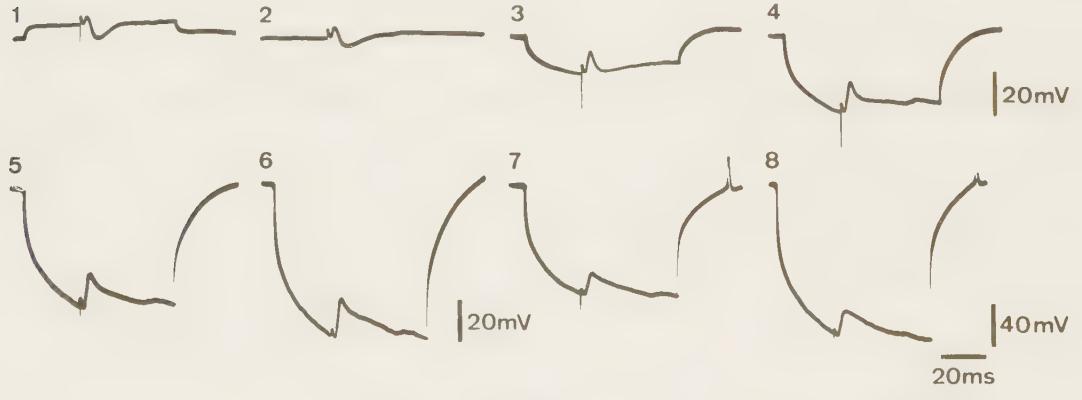


Fig. 5 - Variations du potentiel membranaire et du potentiel postsynaptique biphasique sous l'action de chocs rectangulaires d'intensités croissantes et successivement dépolarisants (photo n°1) et hyperpolarisants (3 à 8). Noter les variations d'amplitude des deux composantes du potentiel biphasique sans qu'il soit possible de préciser nettement l'évolution respective du PPSE et du PPSI.
La microélectrode est située dans le segment intégrateur d'une fibre géante. Potentiel de membrane = 50 mV. Observer le petit potentiel d'action qui succède à un choc hyperpolarisant de grande amplitude (photos n°7 et 8).

Ces faits suggèrent par conséquent que ce potentiel biphasique correspond à la sommation d'un PPSE et d'un PPSI dus à l'activation des afférences cercales. Malheureusement, l'utilisation de la microélectrode n'autorise pas de plus amples déductions. Les conditions de stimulation (nerfs X et XI plongés dans le même compartiment et pouvant vraisemblement être stimulés simultanément) ne favorisent pas la séparation de ces deux composantes.

La présence d'une portion de fibre géante ("segment intégrateur") inexcitable est intéressante sur le plan fonctionnel. Nous aurons l'occasion d'y revenir plus loin (voir conclusion générale).

2° - Enregistrements situés approximativement sur la ligne médiane et dans la moitié antérieure du ganglion:

Il est plus délicat d'introduire une microélectrode en position franchement intracellulaire dans cette zone (vraisemblablement dans les fibres géantes) . Ces difficultés paraissent liées à un rétrécissement de la fibre géante (voir fig. 12). Cependant le potentiel de membrane y est plus élevé (75 mV). Là encore nous pouvons enregistrer des PPSEs unitaires et beaucoup plus rarement des PPSIs unitaires. Ces divers potentiels sont néanmoins plus petits, voire même pratiquement invisibles (PPSIs).

La stimulation électrique des nerfs cercaux homo-ou contralatéraux déclenche le plus fréquemment un PPSE dont l'amplitude augmente progressivement et peut atteindre 15 à 20 mV. Sa durée est voisine de 15 ms et sa phase de montée de 2 ms environ. Lorsque le seuil est atteint, un potentiel d'action d'une amplitude maximum de 75 mV se greffe sur le PPSE (fig. 6). La stimulation antidromique appliquée sur les connectifs entraîne toujours un potentiel d'action qui n'est pas greffé sur une dépolarisation préalable ; en outre il présente toujours un potentiel consécutif négatif et jamais " d'overshoot " (fig. 6 C).

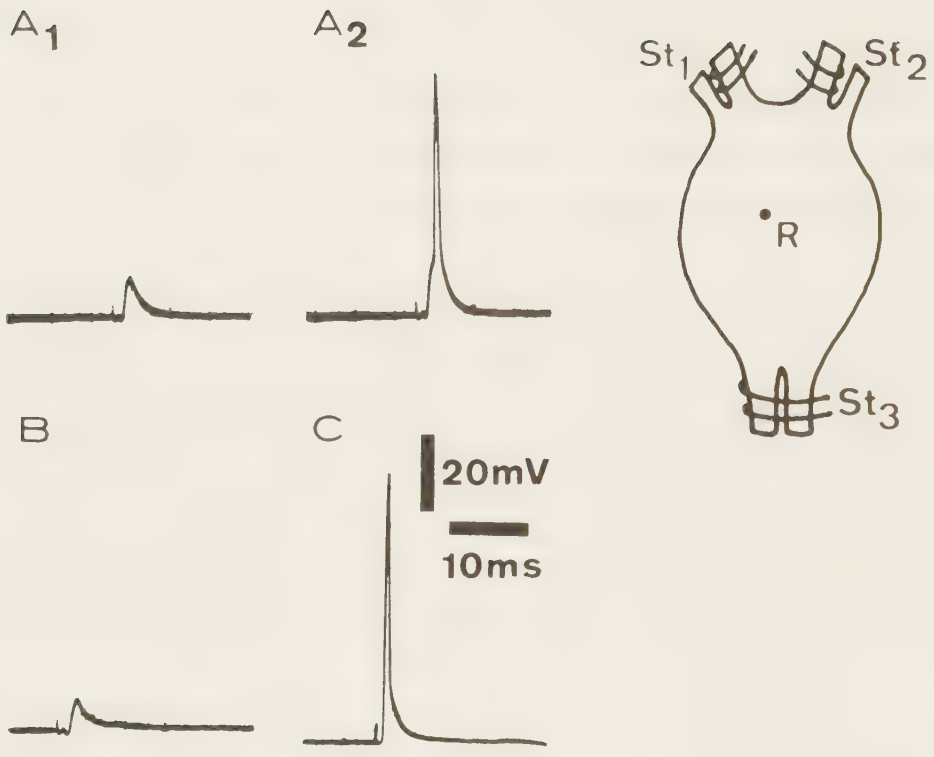


Fig. 6 - PPSEs et potentiels d'action ortho- et antidromiques enregistrés par microélectrode intracellulaire au niveau du segment excitable d'une fibre nerveuse géante.

A : PPSE homolatéral (St_1) capable d'engendrer un potentiel d'action propagé (A_2) pour une intensité de stimulation légèrement plus élevée.

B : La stimulation contralatérale (St_2) maximale développe un PPSE qui reste cependant sous-liminaire.

C : Potentiel d'action antidromique (St_3). Il apparaît en tout ou rien et ne se greffe pas sur un PPSE. Noter l'absence de potentiel consécutif positif.

R: Site d'enregistrement à 180 µm de profondeur , par la face dorsale. Potentiel de membrane = 75 mV.

Il est parfois également possible de dériver dans cette zone un potentiel biphasique (notamment par la stimulation contralatérale) plus petit que celui enregistré postérieurement (la phase dépolarisante atteint environ 7 mV et la composante hyperpolarisante 5 mV). Il a un double effet, facilitateur ou inhibiteur, selon que l'interférence avec le PPSE homolatéral se fait sur l'une ou l'autre des deux composantes (fig. 7). Ces faits tendent à confirmer la double nature de ce potentiel (sommation d'un PPSE et d'un PPSI).

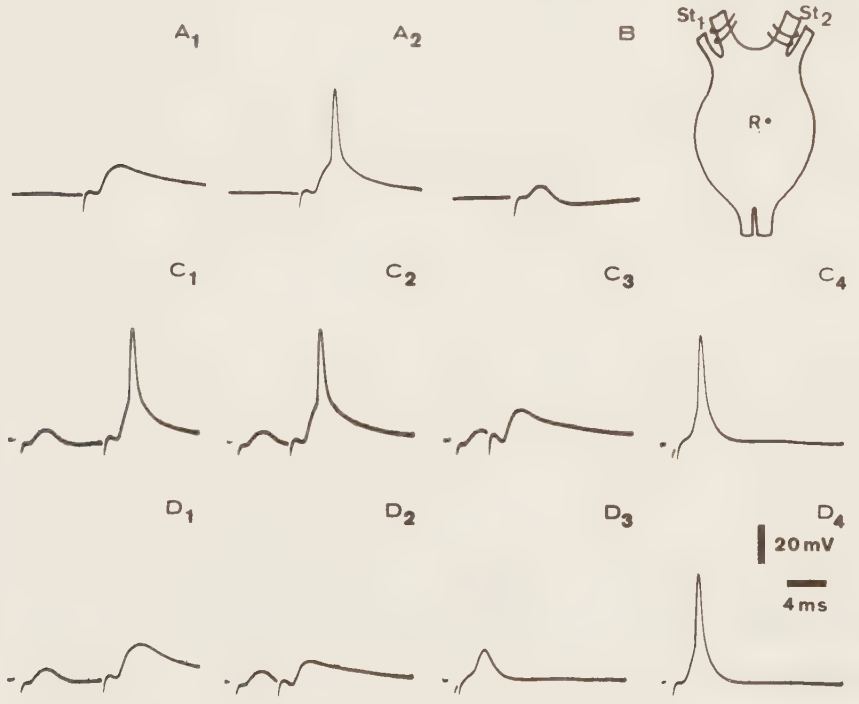


Fig. 7 - Facilitation et inhibition synaptiques spatiales obtenues par la stimulation des nerfs cercaux XI, à l'aide de chocs électriques appliqués successivement en St_1 et St_2.

A : PPSE sous-liminaire (A_1) et juste liminaire (A_2) dus à la stimulation homolatérale (St_2).

B : Potentiel postsynaptique biphasique (PPSB) développé par la stimulation maximale contralatérale (St_1).

C : Stimulations appliquées successivement en St_1 et St_2, St_2 étant juste supra-liminaire. Il y a inhibition du potentiel d'action en C_3, lorsque le PPSE se situe au niveau de la composante hyperpolarisante du PPSB. Il réapparaît en C_4.

D : Même expérience mais St_2 reste sous-liminaire. Le PPSE diminue en D_2 et subit une facilitation nette en D_4, lorsqu'il se superpose à la composante dépolarisante du PPSB.

R : Point d'enregistrement de la microélectrode localisée à 90 µm de profondeur, dans une fibre géante, au niveau d'une zone partiellement excitable. Le potentiel d'action est relativement petit et n'affecte pas le PPSE sous-jacent. Potentiel de membrane = 75 mV.

En résumé, nous avons vu que dans cette zone il est possible d'enregistrer de grands potentiels d'action, ce qui démontre le voisinage d'une zone excitable particulière qui pourrait être le site initial des influx propagés. Les potentiels d'action n'envahissent pas la zone postérieure inexcitable, où l'on rencontre par ailleurs des PPSEs et PPSIs unitaires plus amples. Nous pouvons concevoir que la zone antérieure (site initial) succède au segment intégrateur et que le rôle de ce dernier serait de collecter des influences excitatrices et inhibitrices essentiellement localisées à ce niveau . Nous verrons plus loin si ce schéma peut être conservé ou au contraire abandonné.

Chapitre III

Données biochimiques, histochimiques et pharmacologiques.

Les Insectes constituent vraiment un matériel de choix pour des études pharmacologiques. La plupart d'entre elles ont d'ailleurs été motivées par la lutte rendue souvent nécessaire pour limiter leur prolifération ou plus simplement pour leur destruction lorsqu'ils étaient considérés comme vecteurs de maladies. Autrement dit, il s'agissait de rechercher des substances aussi efficaces que possible et, autant que faire se peut, aussi spécifiques que possible. Ces substances sont appelées "insecticides" ou "pesticides" Le nombre de composés ayant été testé dans ce but est certainement, à l'heure actuelle, extrêmement élevé. Ce nombre était déjà voisin de 50 000 en 1959 (MOOREFIELD et LANHAM, cités par CHADWICK, 1963). Sur ces 50 000 composés, 36 seulement auraient été, à cette date, lancés dans le circuit commercial. Il est intéressant de souligner que de nombreux insecticides efficaces sont en fait des substances anticholinestérasiques, c'est-à-dire des substances inhibitrices d'enzymes qui hydrolysent l'acétylcholine (ACh). Cela signifie que l'ACh joue certainement un rôle très important dans la vie des Insectes, en particulier au niveau des fonctions nerveuses. De nombreuses recherches en découlèrent; elles tentèrent de dégager et de préciser ce rôle.

La littérature abonde en effet en travaux relatifs au système cholinergique.

Afin de faire le point sur la question, tout en ne traitant que les sujets qui peuvent être rattachés à l'étude de la transmission synaptique, nous séparerons les données obtenues par des techniques purement biochimiques de celles acquises par des méthodes pharmacologiques souvent associées à des techniques électrophysiologiques. Dans chaque cas nous ferons également le point sur l'intervention possible d'autres systèmes médiateurs dont l'étude commence à se développer chez les Insectes:

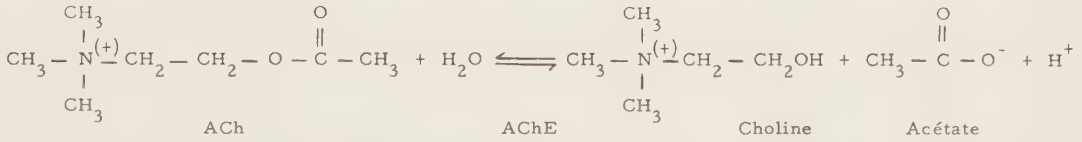
- Les acides aminés (acide γ aminobutyrique (GABA), acide glutamique).
- Les catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine).
- Les indolamines (surtout sérotonine ou 5-hydroxytryptamine).

A - DONNEES BIOCHIMIQUES ET HISTOCHIMIQUES .

Identification et localisation des médiateurs possibles.

1 - SYSTEME CHOLINERGIQUE .

L'acétylcholine (ACh) en relation avec deux enzymes, l'acétylcholinestérase (AChE) et la cholineacétylase (ChAc) constituent les éléments essentiels de ce qu'il est convenu d'appeler le système cholinergique. La ChAc serait contenue dans l'élément présynaptique et permettrait la synthèse de l'ACh tandis que l'AChE, localisée dans l'espace extracellulaire, au contact des membranes, hydrolyserait l'ACh selon la réaction :



La première étape dans l'identification d'un médiateur consiste à démontrer la présence de ces trois substances .

a) Acétylcholine .

Chez la Blatte , elle a surtout été identifiée et dosée par des techniques biologiques . Cet ester de la choline est extrêmement fréquent chez les Insectes et dans le SNC en particulier (voir tableau III). On peut remarquer que les investigations ont surtout porté sur *Periplaneta americana*. Les taux d'ACh rencontrés sont souvent bien plus élevés que ceux d'autres animaux , c'est-à-dire de 3 à 30 fois plus élevés que dans le cerveau des Vertébrés ou les ganglions de certains Mollusques . Les différences que certains auteurs ont pu noter pour un même tissu d'une même espèce

TABLEAU III

Eléments du Système Cholinergique dans le SNC des Insectes .

Ordres et espèces	Tissu nerveux	ACh	AChE	ChAc	Auteurs
DICTYOPTERES					
Periplaneta americana	Ganglion A_6	63	314	18	COLHOUN, 1958 a,c - 1959
	Gg A_6+ n.cerc.+connec.		+		IYATOMI & KANESHINA, 1958
	Nerfs cercaux	1,4/60 nerfs	150	3	COLHOUN, 1958 a,c - 1959
	Chaîne nerveuse ventr.	70	+		MIKALONIS & BROWN, 1941
	Chaîne nerveuse ventr.	32			ROEDER, 1948 b
	Chaîne nerveuse ventr.		+		CHAMBERLAIN & HOSKINS, 1951
	Chaîne nerveuse	+			CHANG & KEARNS, 1955
	Chaîne nerveuse		+		CHADWICK & HILL, 1947
	Chaîne nerveuse			+	SMALLMAN & PAL, 1957
	Chaîne nerveuse abd.	63	270	10	COLHOUN, 1958 a,c - 1959
	Chaîne nerv.abd.-gg A_6	65	187	6	COLHOUN, 1958 a,c - 1959
	Chaîne nerveuse		+		METCALF,MAXON, FUKUTO & MARCH, 1956
	Chaîne nerv. thorac.	79	221	11	COLHOUN, 1958 a,c - 1959
	Ggs abd^x. + 3ème thora.		1,22 (1)		YAMASAKI & NARAHASHI, 1960
	Ggs thoraciques 1 et 2		1,35 (1)		YAMASAKI & NARAHASHI, 1960
	Ggs thoraciques	95	331	20	COLHOUN, 1958 a,c - 1959
	Ggs thoraciques	58			TOBIAS, KOLLROS & SAVIT, 1946
	Ggs thoraciques		+		KERKUT, OLIVER, RICK & WALKER, 1970
	Chaîne thoracique	46		+	TOBIAS, KOLLROS & SAVIT, 1946
	Chaîne thoracique	36,7			LEWIS & SMALLMAN, 1956
	Chaîne thoracique	66			SMALLMAN & FISHER, 1958
	Connectifs thoraciques	31	238	2	COLHOUN, 1958 a,c, - 1959
	Connectifs	33			TOBIAS, KOLLROS & SAVIT, 1946
	Ggs cérébroïdes	143	137	50	COLHOUN, 1958 a,c - 1959
	Ggs cér.+gg ss-eosoph.	135	153	53	COLHOUN, 1958 a,c - 1959
	Ggs cérébroïdes		+		FRONTALI, PIAZZA & SCOPELLITI, 1971
	Tête		+		OLIVER, TABERNER, RICK & KERKUT, 1971
	Tête	8	+		CORTEGGIANI & SERFATY, 1939
	Tête	9,8			LEWIS & SMALLMAN, 1956
ORTHOPTERES					
Gryllus domesticus	Tête	7-10	+		CORTEGGIANI & SERFATY, 1939
	Ggs cérébroïdes	65	+		CORTEGGIANI & SERFATY, 1939
Schistocerca gregaria	Tête	60		+	BELLAMY, 1958
CHELEUTOPTERES					
carausius morosus	Tête	8-9	+		CORTEGGIANI & SERFATY, 1939
HEMIPTERES					
Rhodnius prolixus	Chaîne nerveuse		+		WIGGLESWORTH, 1958- 1959 a,b
COLEOPTERES					
Leptinotarsa decemlineata	Tête	3-10	+		CORTEGGIANI & SERFATY, 1939
Carabus auratus	Tête	45-55	+		CORTEGGIANI & SERFATY, 1939
Tenebrio molitor	Tête	20-35	+	+	LEWIS & SMALLMAN, 1956
	Tête		+		O'BRIEN, 1953
DIPTERES					
Musca domestica	Tête	1,5			CHEFURKA & SMALLMAN, 1956
	Tête	26			LEWIS & SMALLMAN, 1956
	Tête		2700		SMALLMAN, 1958
	Tête			6	FRONTALI, 1958;COLHOUN, 1958 a MEHROTRA, 1961
	Tête	44			COLHOUN, 1958 c
	Tête		+		CHADWICK, 1964
	Ggs cérébroïdes	80			COLHOUN, 1958 c
	Tête		+		DAUTERMAN, TALENS & VAN ASPEREN 1962
	Système nerveux centr.		+		MOLLOY, 1961
Lucilia sericata	Tête	6,3		+	LEWIS, 1953
Calliphora erythrocephala	Ggs cérébroïdes	500			LEWIS & SMALLMAN, 1956
LEPIDOPTERES					
Platysamia cecropia	Ggs cérébroïdes	+	+	+	VAN DER KLOOT, 1955
Antheraea pernyi Guer.	Ggs ss-oesoph + gg. métath.+ dernier gg.abd.		+		TYSHTCHENKO, MANDELSTAM, 1965
HYMENOPTERES					
Apis mellifica	Ggs cérébroïdes		+		METCALF & MARSH, 1949
	Tête	+	+		GAUTRELET, 1938
	Tête	9			AUGUSTINSSON & GRAHN, 1954
Xylocopa violacea	Ggs cérébroïdes	200			CORTEGGIANI & SERFATY, 1939

ACh = µg/g tissu frais .
AChE = ACh (mg) hydrolysée /g tissu/h.
ChA_c = ACh (mg) synthétisée/g tissu/ h.
(1) µM ACh hydrolysée/mg tissu/h.

(chaîne nerveuse de *Periplaneta americana*) pourraient, selon COLHOUN (1963 a), être liées à la méthode d'extraction et aussi au fait que la valeur indiquée est exprimée soit en poids sec, soit en poids frais.

Ces estimations étant faites à l'aide de techniques biologiques, il reste a démontrer si la substance identifiée est réellement l'ACh ou bien une substance voisine qui aurait les mêmes propriétés. La détection et, si possible, la localisation de l'ACh dans les terminaisons cercales, est indispensable pour affirmer son rôle dans la transmission synaptique.

b) Acétylcholinestérase (AChE)

A l'aide de techniques biochimiques et histochimiques, on a pu localiser et tester l'activité de l'AChE chez de nombreux Insectes (voir tableau III). Cependant, selon MANDELSTAM (1969), les propriétés chimiques de l'AChE ont été plus mal étudiées que chez les Vertébrés, ce qui ne permet pas, d'une façon suffisamment détaillée, de trancher la question de la spécificité biochimique de la cholinestérase des Insectes par rapport à l'AChE des Vertébrés.

Les renseignements les plus précis ont été obtenus au microscope optique par WIGGLESWORTH (1958) et au microscope électronique par SMITH et TREHERNE (1965).

WIGGLESWORTH a étudié la distribution de l'activité estérasique dans les ganglions nerveux de *Rhodnius* . Les réactions estérasiques au niveau du neuropile peuvent être supprimées par l'ésérine qui est un inhibiteur des cholinestérases et par le 1-5 bis-(4-trimethyl-ammonium-phényl) pentane-3-1-diiodide (62.C.47) qui est inhibiteur spécifique de l'AChE des Vertébrés . WIGGLESWORTH conclut ainsi à la présence d'une AChE spécifique dans le neuropile de *Rhodnius* .

SMITH et TREHERNE (1965) ont, au microscope électronique , démontré la présence d'une estérase (sans doute une cholinestérase) sensible à l'ésérine, en très grande quantité, fixée uniquement au niveau des membranes dans le neuropile du ganglion A_6 de *Periplaneta americana* . Un fait important est que cette estérase se présente en zones discontinues et qu'elle est souvent associée à des axones contenant des vésicules synaptiques.

SMITH et TREHERNE (1965) pensent que ces observations apportent une visualisation directe de sites synaptiques cholinergiques dans ce neuropile.

Plusieurs travaux montrent que l'activité cholinestérasique est pratiquement nulle au niveau de la membrane des corps cellulaires (1) (WIGGLESWORTH, 1958; MANDELSTAM, 1963; SMITH et TREHERNE, 1965). Ces résultats contrastent avec ceux qui ont été obtenus chez les Vertébrés où les corps cellulaires des neurones cholinergiques ont toujours montré une telle activité (KOELLE, 1954). Cette différence est certainement à rapprocher de l'absence de synapses anatomiquement différenciées au niveau des corps cellulaires chez les Insectes . L'activité cholinestérasique reste donc localisée au niveau neuropilaire, précisément là où se situent tous les contacts synaptiques.

Toujours dans le ganglion A_6 ,SMITH et TREHERNE (1965) ont également identifié une estérase insensible à l'ésérine . Une telle estérase est inhibée par contre par le tétraéthylpyrophosphate (TEPP) et le tri-ortho-crésyl-phosphate (COLHOUN, 1960; STEGWEE, 1960), mais ne serait pas impliquée dans l'activité nerveuse (COLHOUN, 1960).

Des expériences récentes utilisant l'ACh marquée au C_{14} (TREHERNE et SMITH , 1965 a et b) ont permis de démontrer le rôle important joué par la cholinestérase dans les espaces extracellulaires du ganglion A_6 . En présence d'ésérine, l'accumulation de radioactivité dans le ganglion est beaucoup moins élevée qu'en son absence. Cet inhibiteur de la cholinestérase empêche l'hydrolyse de l'ACh, ce qui diminue considérablement le gradient de concentration de l'ACh de part et d'autre de la gaine du ganglion. Ces auteurs en concluent que l'ACh traverse aisément la gaine et que sa distribution s'effectuerait entre les espaces extracellulaires intra-ganglionnaires et l'hémolymphe selon un équilibre de Donnan.

(1) SMITH et TREHERNE (1965) ont cependant observé que les membranes gliales enveloppant les corps cellulaires présentent quelque activité cholinestérasique.

c) Cholineacétylase (ChAc) = Cholineacétyltransférase.

Le mécanisme de synthèse de l'ACh chez les Insectes a été clarifié par SMALLMAN (1956, 1961) à partir d'expériences effectuées sur des têtes de *Musca domestica* (Diptère).
Il se fait en deux temps in vitro:

1° - ATP + CoA + acétate $\rightleftharpoons$ acétyl CoA + AMP + pyrophosphate

2° - Acétyl CoA + choline $\xrightarrow{\text{ChAc}}$ ACh + CoA

La ChAc est l'enzyme catalysant la seconde réaction. Il apparaît, d'après le tableau III, que cette enzyme est très fréquemment rencontrée chez les Insectes et en particulier dans le système nerveux, où elle se trouve à une concentration bien plus élevée que dans les autres tissus. Cependant on ne peut rien dire sur sa localisation histologique précise.

D'après CHADWICK (1963), il semble peu probable que la grande quantité d'ACh des Insectes provienne de cette seule source car un accroissement d'ACh n'est pas toujours lié à une inhibition de la ChE ou à une activation nette de la ChAc.

Chez *Periplaneta americana* , l'activité de la ChAc a été testée par TOBIAS, KOLLROS et SAVIT (1946), SMALLMAN et PAL (1957) et COLHOUN (1958 a et 1959). Il apparaît que l'activité de cette enzyme est plus élevée dans les ganglions cérébroïdes et le ganglion sous-oesophagien. Il existe également une relation étroite entre la concentration en ACh et l'activité de la ChAc dans différentes parties du tissu nerveux de cet Insecte (TREHERNE, 1966). Ces résultats semblent quelque peu en contradiction avec l'assertion de CHADWICK (1963), énoncée plus haut.

2 - AUTRES SUBSTANCES PRESENTES DANS LE SNC DES INSECTES.

Malgré les études intensives qui ont porté sur l'ACh chez les Insectes, la biochimie du système nerveux reste peu développée. Cependant, depuis quelques années, certaines expériences ont dévoilé la présence de substances pharmacologiquement actives pouvant être retenues comme médiateurs possibles . Il s'agit essentiellement de certains acides aminés (acides γ aminobutyrique (GABA) et glutamique), de catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline) et d'une indolamine (sérotonine = 5-hydroxytryptamine). Voir tableau IV.

a) Acides aminés .

De nombreux acides aminés sont présents dans le SNC des Insectes et en particulier dans la chaîne nerveuse ventrale de *Periplaneta americana* (RAY , 1964, 1965) . Nous retiendrons essentiellement le GABA et l'acide glutamique qui sont présents en assez grande quantité et qui sont de sérieux candidats comme médiateurs chimiques à la jonction neuromusculaire des Insectes.

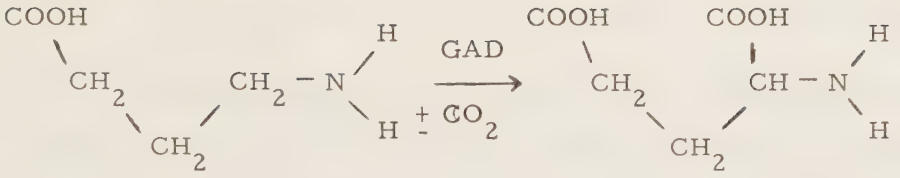
Le GABA serait le médiateur inhibiteur (USHERWOOD et GRUNDFEST, 1964 et 1965 ; KERKUT, SHAPIRA et WALKER, 1965) tandis que le glutamate serait le médiateur excitateur (USHERWOOD et GRUNDFEST , 1965 ; KERKUT, LEAKE, SHAPIRA, COWAN et WALKER, 1965; USHERWOOD et MACHILI, 1966 et 1968; USHERWOOD, COCKRANE et REES, 1968; USHERWOOD, MACHILI et LEAF, 1968; BERANEK et MILLER, 1968).

Comme dans le SNC des Vertébrés, la concentration en GABA semble être maintenue par décarboxylation de l'acide glutamique . On a pu en effet montrer que l'enzyme responsable de cette décarboxylation (décarboxylase de l'acide glutamique) est active par exemple dans les ganglions thoraciques de *Periplaneta americana* (OLIVER, TABERNER, RICK et KERKUT, 1971) et dans des homogénats de ganglions cérébroïdes d'abeilles (FRONTALI, 1961 et 1964).

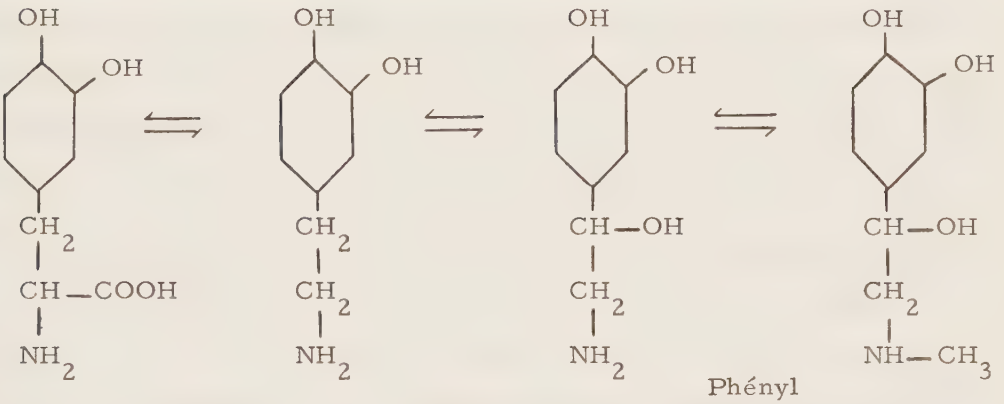
TABLEAU IV

Acides aminés + monoamines dans le SNC des Insectes

Ordres et espèces	Age + sexe	Tissu nerveux	Dopamine µg/g tissu frais	Nor-adrénaline µg/g tissu frais	Adrénaline	Sérotonine µg/g tissu frais	GABA mM/g tissu frais	Glutamate mM/g tissu frais	GAD	Auteurs
DICTYOPTERES										
Periplaneta americana		Chaîne nerveuse					2,5	4,5		RAY, 1964
		Chaîne ventrale				+				COLHOUN, 1963 a
		Ganglions thoraciques					+		+	OLIVER, TABERNER, RICK & KERKUT, 1971
		Ganglions thoraciques					+	+	+	HUGGINS, RICK & KERKUT, 1967.
	Ad ♂	Corps pédonculés	+	+						MANCINI & FRONTALI, 1970
		Ggs cérébr.+ ss-oesoph.	2,5	0,37	0					FRONTALI & HAGGENDAL, 1969
	Ad♂♀	Ggs cérébr.+ ss-oesoph.	Catécholamines non spécifiées							FRONTALI, 1968
	Ad♂♀	Ggs cérébr.+ ss-oesoph.	+	+						FRONTALI & NORBERG, 1966
		Ganglions cérébroïdes				+				COLHOUN, 1963 a
		Système nerveux				+				GERSCH, FISCHER, UNGER & KABITZA, 1961
Blaberus gigantea		Chaîne nerveuse				0,02				WELSH & MOORHEAD, 1960
		Tête et segments thor.				0,05				WELSH & MOORHEAD, 1960
ORTHOPTERES										
Schistocerca gregaria		Chaîne nerveuse							+	BRADFORD, CHAIN, CORY & ROSE, 1969
DIPTERES										
Calliphora erythrocephala		Ganglions cérébroïdes	Catécholamines non spécifiées			+				RAMADE & L'HERMITE, 1971
Musca domestica		Ggs cérébr. (corps central et pédonculés)				+				RAMADE & L'HERMITE, 1971
TRICHOPTERES										
Anabolia nervosa	Ad	Ggs cérébr.+ ss-oesoph.	Catécholamines non spécifiées							KLEMM, 1968
	Ad♂♀	Ganglions thoraciques	2,42-5,10	0,35-0,75	0					BJÖRKLUND, FALCK & KLEMM, 1970
	Ad♂♀	Tête	3,26-3,52	0,29-0,32	0	0				KLEMM & BJÖRKLUND, 1971
HYMENOPTERES										
Apis mellifica		Ganglions cérébroïdes					10,6	50,0	+	CARTA, FRONTALI & VIVALDI, 1961 FRONTALI, 1964
		Ganglions cérébroïdes							+	FRONTALI, 1961
		Tête				0,07-0,16				WELSH & MOORHEAD, 1960
		Ganglions cérébroïdes					+	+	+	FOX & LARSEN, 1972

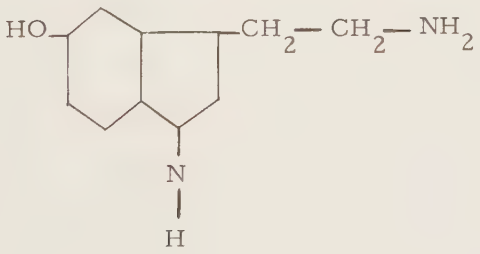


GABA — Acide glutamique



Dopa décarboxylase — Dopamine beta-hydroxylase — Phényl éthanolamine-N méthyltransférase

DOPA (dihydroxyphénylalanine) — DOPAMINE — NA (L-Noradrénaline) — ADRENALINE



Sérotonine

b) Catécholamines.

L'adrénaline, ainsi que des composés voisins, sont présents chez de nombreux Insectes (OSTLUND, 1954; VON EULER, 1961). Il ressort de ces travaux que la teneur en adrénaline oscille entre 0,01 et 0,30 µg/g, celle de la noradrénaline de 0,045 à 2,2 µg/g et le taux de dopamine de 1 à 15 µg/g. Selon HODGSON et WRIGHT (1963), la présence de 10 à 20 fois plus de dopamine et de noradrénaline pourrait être expliquée par le fait que ce sont des précurseurs dans la synthèse de l'adrénaline.

En fait ces données ont été acquises sur l'animal entier. Cependant, par l'utilisation de la technique histochimique associée à la fluorescence FALCK et OWMAN (1965), FRONTALI (1968),FRONTALI et NORBERG (1966)et MANCINI et FRONTALI (1970) ont localisé plus précisément un certain nombre de cellules contenant des catécholamines dans les ganglions cérébroïdes et le ganglion sous-oesophagien de *Periplaneta americana* . Il s'agirait (FRONTALI et HÄGGENDAL, 1969) essentiellement de noradrénaline (0,37 µg/g de tissu frais) et surtout de dopamine (2,5 µg/g).

Selon MANCINI et FRONTALI (1970), les sites de stockage des catécholamines ont des caractéristiques similaires chez les Vertébrés et les Invertébrés. Ces considérations sont basées sur la morphologie (taille des vésicules synaptiques qui sont néanmoins un peu plus petites, 320 Å au lieu de 500),sur les mécanismes de stockage et de déplétion (par la réserpine, par exemple), et sur les conditions nécessaires à leur visualisation structurale (fonction du type de fixateur utilisé).

Compte-tenu de la concentration élevée en dopamine et de son identification histochimique dans le corps central et le lobe β des corps pédonculés, ces auteurs lui accordent un rôle possible comme médiateur chimique. Ils sont rejoints en cela par BJÖRKLUND, FALCK et KLEMM (1970), qui ont pu , grâce au microscope électronique, localiser sa présence dans certains corps cellulaires et dans des " varicosités " de certaines terminaisons axoniques, au niveau des ganglions thoraciques d'un Trichoptère (*Anabolia nervosa*).

c) Sérotonine (= 5-hydroxytryptamine = 5-HT = Entéramine)

Cette indolamine est présente dans le système nerveux et les corpora cardiaca de *Periplaneta americana* (GERSCH, FISCHER, UNGER et KABITZA, 1961; COLHOUN, 1963 a).

Utilisant des techniques variées, chromatographie, absorption dans l'ultraviolet et spectrophotofluorométrie, COLHOUN (1963 a) a identifié en particulier un composé monophénolique ayant des propriétés caractéristiques de la sérotonine. Il a également montré que sa synthèse est possible dans des extraits de tissu nerveux et notamment qu'une décarboxylase utiliserait comme substrat le 5-hydroxytryptophane (5-HTP) qui est le précurseur métabolique de la sérotonine.

Aucune trace de sérotonine n'a pu être détectée, soit chimiquement dans la tête, soit histochimiquement, dans les ganglions cérébroïdes des Trichoptères (KLEMM et BJÖRKLUND, 1971).

Il serait souhaitable d'intensifier les recherches histochimiques de la sérotonine à l'aide par exemple de la méthode de FALCK et OWMAN (1965). A notre connaissance, cela n'a pas été tenté au niveau du ganglion A_6 de *Periplaneta americana* bien que la sérotonine joue certainement un rôle important à ce niveau (voir p. 66).

B - DONNEES PHARMACOLOGIQUES ET ELECTROPHYSIOLOGIQUES

Plusieurs auteurs ont insisté sur le fait qu'il était nécessaire d'associer ces deux techniques afin de dégager d'autres critères susceptibles de combler les lacunes dans l'identification des médiateurs chez les Insectes. De nombreux essais ont été tentés, essentiellement pour le système cholinergique, mais ils se sont tous heurtés à de grandes difficultés techniques. Quelques données récentes accordent un certain crédit au GABA en tant que médiateur inhibiteur central et une importance de plus en plus grande à certaines catécholamines et à la sérotonine . Nous rassemblerons les résultats déjà obtenus en insistant tout particulièrement sur les données se rapportant au ganglion A_6 de *Periplaneta americana* , car c'est là encore qu'ils sont de loin les plus nombreux.

Toutes les expériences citées ont utilisé comme contrôle électrophysiologique de la transmission synaptique, des électrodes externes placées sur les nerfs ou les connectifs, sauf celles qui ont testé la sensibilité de la membrane de certains corps cellulaires du même ganglion . Lorsqu'il est question de l'activité des fibres géantes, le critère d'identification utilisé tient compte de la taille des potentiels d'action. Malheureusement ce critère n'est pas toujours sûr car il existe un certain nombre de fibres géantes de second ordre d'un diamètre voisin de 20 µm.

1 - SYSTEME CHOLINERGIQUE.

a) Action de l'acétylcholine (ACh).

α - Action de l'ACh sur le ganglion A_6

L'acétylcholine appliquée seule sur le ganglion A_6 non dégainé de *Periplaneta americana* , même à forte concentration (jusqu'à 10^{-2}M) semble n'avoir aucun effet sur la transmission synaptique (ROEDER, KENNEDY et SAMSON, 1947 ; ROEDER, 1948 b), bien qu'elle augmente légèrement l'activité " spontanée " enregistrée sur la chaîne à une concentration de 10^{-3} M (ROEDER et ROEDER , 1939) et *a fortiori* à 10^{-2} M (YAMASAKI et NARAHASHI, 1958, 1960). Par contre, sur le ganglion dégainé , l'ACh à 10^{-2} M (TWAROG et ROEDER, 1956 et 1957) et même à 10^{-3} M (YAMASAKI et NARAHASHI, 1960) a un effet rapide et prononcé se traduisant d'abord par des décharges d'influx de plus en plus nombreuses sur la chaîne, auxquelles succède un blocage complet de la transmission. Cependant, à 10^{-4} M, l'action est pratiquement nulle (YAMASAKI et NARAHASHI, 1960). TWAROG et ROEDER (1956) constatent que le seuil d'action sur ganglion dégainé est alors de 3 à 5.10^{-3} M. Ces concentrations sont ainsi de l'ordre de 100 fois plus élevées que celles nécessaires aux ganglions sympathiques des Vertébrés et à la jonction neuromusculaire.

Cette difficulté pour l'ACh de pénétrer dans le SNC a été identifiée par certains auteurs (TWAROG et ROEDER, 1956; O'BRIEN et FISHER, 1956; O'BRIEN, 1957) sous la forme d'une barrière de diffusion localisée dans la gaine du ganglion, compte-tenu du fait que l'ACh est sous forme ionisée. En fait, l'ACh pénètre rapidement dans le système extracellulaire entourant les cellules nerveuses et gliales (TREHERNE et SMITH , 1965 a). Il est possible que les sites synaptiques soient protégés par une intense activité cholinestérasique associée en particulier au réseau glial (SMITH et TREHERNE, 1963 ; TREHERNE, 1966).

Certains résultats montrent en effet qu'il y a une hydrolyse rapide de l'ACh à la périphérie du ganglion. TREHERNE et SMITH (1965 b) ont évalué à $8,1 \times 10^{-5}$ M la concentration de l'ACh dans les espaces extra -

cellulaires intraganglionnaires, lorsque le ganglion est baigné par une solution à 10^{-2} M. La meilleure sensibilité observée lorsque le ganglion est dégainé (YAMASAKI et NARAHASHI, 1960 ; TWAROG et ROEDER, 1956 et 1957) peut aisément s'expliquer par une désorganisation du réseau glial périphérique du ganglion lors de la dissection de la gaine .

Afin de supprimer cette barrière cholinestérasique, SHANKLAND, ROSE et DONNIGER (1971) ont exposé le ganglion A_6 à des anti-ChE (paraoxon et dichlorvos) dans le but d'éviter la destruction rapide de l'ACh appliquée, et à l'hémicholinium-3 (HC-3) qui est reconnue comme une drogue capable de bloquer la synthèse de l'ACh. Après épuisement du médiateur par stimulation de longue durée, l'ACh appliquée sur la masse ganglionnaire s'est révélée capable de déclencher sur la chaîne une légère activité à des concentrations bien plus faibles (voisines de 10^{-7} M).

Néanmoins, les difficultés restent grandes quant à la possibilité de juger du rôle éventuel de l'ACh dans la transmission synaptique ou de la sensibilité de la membrane nerveuse vis-à-vis d'elle. Afin de contourner ces principales difficultés, et notamment la barrière cholinestérasique, nous avons adopté la technique d'injection ionophorétique, technique qui nous permet de déposer des microdoses d'ACh aussi près que possible des sites synaptiques actifs (voir techniques et résultats).

β - Action de l'ACh sur les corps cellulaires du ganglion A_6

Les corps cellulaires périphériques qui sont accessibles à l'examen électrophysiologique (voir p. 30) se sont révélés sensibles à l'ACh (CALLEC et BOISTEL, 1967). Les corps cellulaires préalablement silencieux aussi bien que ceux qui sont autoactifs, répondent à l'application d'ACh par une dépolarisation membranaire entraînant une augmentation de l'activité (fig. 8). Sans aucun traitement préalable du ganglion, la concentration efficace (voisine de 5.10^{-6} M) est nettement moins élevée que celle nécessaire pour affecter la transmission synaptique.

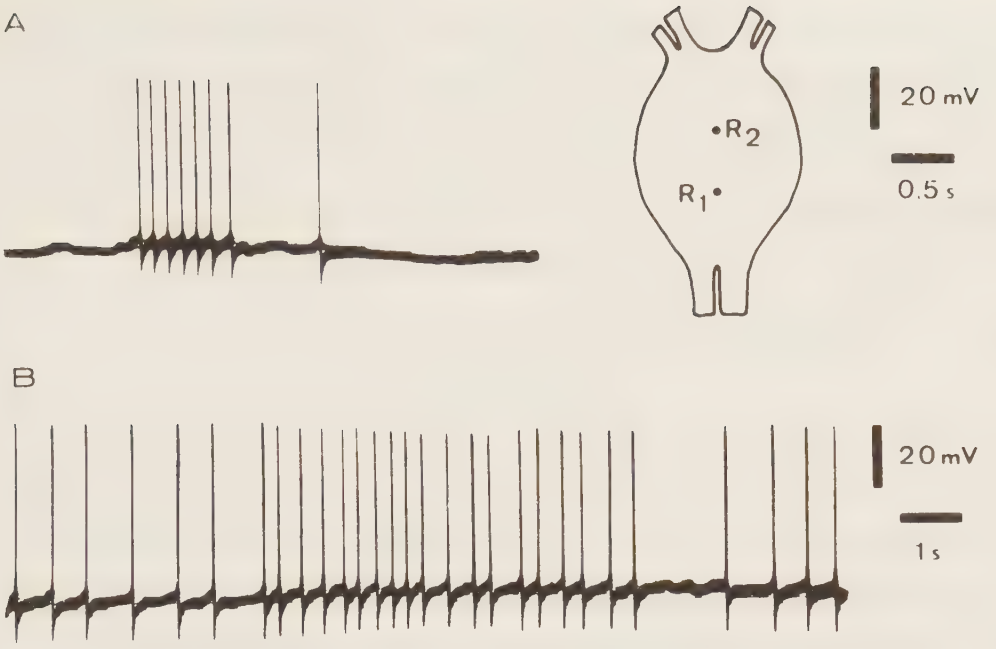


Fig. 8 - Action de l'ACh au niveau de corps cellulaires médio-dorsaux du ganglion A_6.
A : Une solution d'ACh à 10^{-6} g/ml est appliquée sur un corps cellulaire silencieux situé en R_1. Il est le siège d'une dépolarisation transitoire accompagnée d'un train d'influx.
B : Le corps cellulaire R_2 est initialement le siège d'une activité rythmique. L'application d'ACh à 10^{-6} g/ml détermine immédiatement une dépolarisation de courte durée qui s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des influx.

Ces mêmes corps cellulaires ont fait l'objet d'études plus récentes et plus développées par KERKUT, PITMAN et WALKER (1968, 1969 a et b) et PITMAN et KERKUT (1970). L'injection ionophorétique d'ACh à partir d'une deuxième microélectrode placée au voisinage de la première, détermine une dépolarisation dont l'amplitude est proportionnelle à la quantité d'ACh injectée. Le seuil de réponse a été évalué à $1,31. 10^{-13}$ M, valeur obtenue par extrapolation de la courbe " amplitude de la dépolarisation - intensité du courant d'injection " (KERKUT, PITMAN et WALKER, 1969 a et b). Certains corps cellulaires sont envahis par des PPSEs de longue durée liés à la stimulation des connectifs antérieurs. PITMAN et KERKUT (1970) ont montré que ce PPSE a un potentiel d'inversion ($-45,3 \pm 3,1$ mV) voisin de celui lié à la dépolarisation due à l'ACh ($-40,3 \pm 1,6$ mV). Ces auteurs concluent que les deux phénomènes impliquent les mêmes courants ioniques et qu'ils seraient dus aux ions Na^+ et à une part importante d'ions K^+ .

Ces résultats montrent assez clairement que des corps cellulaires de ganglion d'Insecte, malheureusement non identifiés, sont le siège de manifestations synaptiques, mais sans doute conduites électrotoniquement . La membrane de ces corps cellulaires est cholinoceptive. Ces indications restent cependant difficiles à relier à l'activité synaptique neuropilaire.

b) Action de substances analogues à l'ACh.

La manière la plus simple et la plus évidente de caractériser et d'identifier les récepteurs physiologiques de substances candidates-médiateurs chimiques est d'utiliser des composés dont la structure moléculaire est analogue aux substances en question. Ces composés présentent de ce fait bien souvent une grande affinité pour les sites récepteurs.

On distingue les substances qui ont une action identique ou très voisine de celle du médiateur (substances " agonistes ") et au contraire celles qui tendent à freiner ou à empêcher son action (substances antagonistes). Ces substances, en ce qui concerne l'ACh, sont extrêmement nombreuses, mais on se heurte bien souvent à des problèmes de spécificité; par exemple l'acétylcholinestérase présente également des sites récepteurs à l'ACh.

Certaines d'entre elles ont parfois été utilisées chez les Insectes.

α - Substances " agonistes ".

ROEDER (1948 b) a testé l'acétyl-β-méthylcholine et la carbamylcholine (carbachol) sur le ganglion A_6 non dégainé de *Periplaneta americana* , à des concentrations allant jusqu'à 10^{-2} M; ces substances se sont révélées sans aucun effet sur la transmission synaptique, au même titre que l'ACh dans les mêmes conditions.

Cependant, si le ganglion est préalablement dégainé et traité par une substance anti-ChE et HC-3 , il devient particulièrement sensible (concentrations voisines de 10^{-8} M) à l'acétyl-β-méthylcholine et à la nicotine qui développent des effets comparables à ceux de l' ACh (SHANKLAND, ROSE et DONNIGER, 1971) . Cependant, le ganglion présenterait une désensibilisation bien plus importante à la nicotine qu'à l'ACh (FLATTUM et SHANKLAND, 1971).

L'étude comparative de l'efficacité de diverses substances analogues a été également menée sur certains corps cellulaires (KERKUT, PITMAN et WALKER, 1969 b). Ces auteurs ont montré que l'efficacité d'action décroît dans l'ordre: nicotine - carbachol - pilocarpine - ACh.

β - Action de substances antagonistes : d-tubocurarine et atropine

- d-tubocurarine.

Ce composé quaternaire est considéré, notamment à la synapse neuromusculaire des Vertébrés, comme un antagoniste relativement spécifique de l'ACh. Les deux substances entreraient en compétition avec les mêmes sites récepteurs de la membrane postsynaptique. Cette opinion n'est pas à considérer d'une manière aussi catégorique, aussi aurons-nous à en rediscuter plus loin (voir p. 234).

Le " curare " a maintes fois été testé chez les Insectes et notamment sur le ganglion A_6 de *Periplaneta americana* . Les effets observés varient considérablement selon les conditions expérimentales.

Le " curare ",d'après ROEDER (1948 b),serait totalement dépourvu d'effets, sur la transmission dans le ganglion A_6 non dégainé, même à des concentrations allant jusqu'à 10^{-2} M. Cependant,après traitement du ganglion par le DFP, les volées de potentiels d'action qui en résultent sont considérablement réduites par le " curare " à 10^{-5} M bien que la réponse postsynaptique reste présente (ROEDER, KENNEDY et SAMSON, 1947) . Cela indiquerait, selon ces mêmes auteurs, que le " curare " serait capable de protéger dans une certaine mesure les régions postsynaptiques contre l'excès de médiateur non hydrolysé grâce au DFP. Il ne modifie pas non plus (à 10^{-3}M) l'activité du nerf phallique même lorsqu'il est appliqué sur le ganglion A_6 dégainé (MILBURN et ROEDER , 1962).

En maintenant l'action de la d-tubocurarine à des concentrations allant de 10^{-7} à 10^{-4} M pendant une à deux heures sur le même ganglion dégainé, SHANKLAND, ROSE et DONNIGER (1971) et FLATTUM et SHANKLAND (1971) ont pu observer un blocage complet de la transmission entre les fibres cercales et les connectifs antérieurs (comprenant notamment les fibres géantes).

Des injections de d-tubocurarine directement dans le corps de l'animal (LARSEN, MILLER et YAMAMOTO, 1966) développent une paralysie totale chez 16 espèces d'Insectes dont *Periplaneta americana* , à condition d'opérer à une concentration supérieure (3 à 15.10^{-3} g/ml) à celle utilisée par ROEDER et d'autres auteurs.

La d-tubocurarine (concentration non précisée) inhibe aussi l'activité du nerf n°5 par application sur le ganglion métathoracique (KERKUT, PITMAN et WALKER, 1969 b). Ces effets sont irréversibles.

Pour FRIEDMAN et CARLSON (1970),l'action de la d-tubocurarine à forte concentration ($3,2.10^{-2}$ M) se ferait,chez *Periplaneta americana* , essentiellement sur la conduction nerveuse, mais les expériences citées ne semblent pas très convaincantes.

L'accès direct à la membrane des corps cellulaires a permis d'observer que la gallamine (10^{-4} g/ml) (curarisant de synthèse connu sous le nom de Flaxédil) diminue la réponse dépolarisante de l'ACh appliquée par micropipette (CALLEC et BOISTEL, 1967). PITMAN et KERKUT (1970) ont également observé que la gallamine (4.10^{-4} g/ml) supprime le PPSE déclenché dans certains corps cellulaires du même ganglion.

En dehors de *Periplaneta americana*, des essais ont été effectués sur le ganglion prothoracique du criquet *Gampsocleis buergeri* avec de la d-tubocurarine à 3.10^{-4} g/ml (SUGA et KATSUKI, 1961). Ces auteurs ont démontré que la perfusion du ganglion bloque les influx auditifs dans le SNC.

Il ressort de ces différents travaux que les problèmes concernant le rôle de la d-tubocurarine chez les Insectes reste posé. Si manifestement, il ne fait pas de doute qu'il joue un certain rôle, il reste à préciser quel est ou quels sont les sites d'action et dans quelle mesure sa spécificité vis-à-vis de l'ACh est réelle.

- Atropine

Chez les Mammifères, il est souvent admis que l'atropine bloque des sites cholinocepteurs différents de ceux bloqués par la d-tubocurarine. Les premiers sont dits de nature muscarinique et les seconds, de nature nicotinique (DALE, 1914).

Chez les Insectes, les essais n'ont été effectués que sur le ganglion A_6 de *Periplaneta americana*. Ce composé tertiaire anticholinergique s'est révélé aussi inefficace que le " curare " sur le ganglion intact (ROEDER, KENNEDY et SAMSON, 1947; ROEDER, 1948 b). Cependant, à la différence du " curare ", l'atropine, à la concentration de 10^{-2} M, a pu bloquer la transmission dans un ou deux cas (ROEDER, 1948 b). Une action prolongée de l'atropine (une à deux heures) sur le ganglion dégainé s'est montrée efficace en bloquant la transmission entre les fibres cercales et les connectifs antérieurs à des concentrations comprises entre 10^{-7} et 10^{-5} M (SHANKLAND , ROSE et DONNIGER, 1971).

c) Action de substances anticholinestérasiques (Anti-ChE).

Ces substances, en neutralisant l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'ACh, préviennent sa destruction et permettent par conséquent une action prolongée et plus forte du médiateur. Elles ont ainsi un effet facilitateur et ont été utilisées de manière intensive sur le SNC de *Periplaneta americana* et en particulier sur le ganglion A_6.

Les anti-ChE les plus couramment utilisées chez les Insectes sont l'ésérine (ou physostigmine), la prostigmine, le diisopropylfluorophosphate (DFP), le hexaéthyltétraphosphate (HETP) et le tétraéthylpyrophosphate (TEPP).

L'ésérine (ou physostigmine) appliquée sur le ganglion augmente la quantité d'ACh libérée, quantité qui peut être encore accrue par stimulation électrique simultanée. Cela a été mis en évidence à l'aide de techniques biologiques par TOBIAS, KOLLROS et SAVIT (1946) et COLHOUN (1958 b et d).

Selon ROEDER, KENNEDY et SAMSON (1947), l'ésérine et la prostigmine bloquent la transmission synaptique sans aucun signe de facilitation (ganglion non dégainé). Plus précisément, il apparaît que sous un certain seuil (2.10^{-4} M) , il n'y a aucun changement tandis qu'au-dessus, il y a blocage sans période transitoire de facilitation , bien que ces drogues déterminent une augmentation de l'activité " spontanée " qui persiste bien après le blocage. Ces effets sont partiellement réversibles. Cependant , ROEDER (1948 b) et TWAROG et ROEDER (1957) ont observé que , pour des concentrations plus faibles (10^{-5} à $5 . 10^{-5}$ M), l'ésérine peut déclencher de brèves volées de potentiels d'action avec tendance consé-

cutive au blocage de la transmission synaptique dans le système " fibres cercales - fibres géantes " . La prostigmine, par contre, à la même concentration, détermine un blocage synaptique sans facilitation.

Le DFP s'est révélé plus efficace. A la concentration de 6.10^{-4} M, concentration qui peut s'abaisser à 6.10^{-6} M sur le ganglion dégainé (TWAROG et ROEDER, 1957), la stimulation présynaptique cercale (par une brève série de stimuli) déclenche des volées de potentiels d'action dans les fibres géantes, volées pouvant durer 15 à 30 secondes et séparées par des périodes de blocage de 30 secondes à 5 minutes (ROEDER, KENNEDY et SAMSON, 1947; ROEDER, 1948 b). Ces effets ne sont pas réversibles . ROEDER (1948 b) a obtenu des actions similaires avec HETP et TEPP à des concentrations bien plus faibles (3.10^{-7} M). Ces drogues n'ont aucun effet sur la conduction dans les axones géants sinon à des concentrations plus fortes (3.10^{-3} M pour HETP et 6.10^{-2} M pour DFP). ROEDER, KENNEDY et SAMSON (1947) concluent à l'action sélective de ces anticholinestérases au niveau des sites synaptiques.

En utilisant l'ACh marqué au C_{14}, TREHERNE et SMITH (1965 b) ont mis en évidence que l'accumulation de la radioactivité était beaucoup moins importante dans le ganglion A_6 en présence d'ésérine 10^{-4} M. Ces auteurs ont avancé que l'ACh non détruite modifie très rapidement le gradient de concentration,ce qui a pour effet de ralentir considérablement l'entrée de l'ACh. Ces dernières expériences non-électrophysiologiques montrent clairement l'action facilitatrice de l'ésérine par neutralisation de la cholinestérase.

Ces diverses expériences ont été complétées par YAMASAKI et NARAHASHI (1960) par l'action de l'ésérine sur le PPSE enregistré par électrodes externes à la sortie du ganglion. Dix à quarante minutes après l'application d'ésérine à 10^{-5} M, les PPSEs amplifiés et prolongés(jusqu'à 10 secondes), déclenchent une volée de potentiels d'action. Au bout de 30 à 90 minutes, la transmission est complètement bloquée par dépolarisation progressive du ganglion. Cet effet est partiellement réversible. De plus,l'addition d'ésérine à 10^{-5} M rend le ganglion sensible à l'ACh à des doses 10 à 100 fois plus faibles. Le TEPP (10^{-5} à 10^{-6} M) détermine, selon les mêmes auteurs, les mêmes effets que l'ésérine.

L'action de l'ésérine (10^{-5} g/ml) sur le PPSE déclenché dans certains corps cellulaires du ganglion A_6 (PITMAN et KERKUT, 1970)

augmente son amplitude et sa durée et potentialise (à 10^{-6} g/ml) l'action de l'ACh lorsque celle-ci est additionnée au milieu baignant le ganglion (KERKUT, PITMAN et WALKER, 1969 b). Il ne faut pas non plus oublier que certains facteurs ou substances peuvent augmenter la libération de l'ACh sans inhibition détectable de la ChE (voir revue par CHADWICK, 1963). Citons par exemple les expériences de TOBIAS, KOLLROS et SAVIT (1946) sur les tissus nerveux de *Periplaneta americana*, qui montrent une augmentation de 200 % de l'ACh libre de ce tissu sous l'action du DDT (insecticide de formule 1, 1-bis-(p-chlorophényl)-2,2,2-trichloroéthane) sans modification mesurable de la ChE.

2 - ACIDE γ- AMINOBUTYRIQUE (GABA).

Cet acide aminé a une action inhibitrice sur plusieurs préparations d'Insectes.

VERESHTCHAGIN, SYTINSKY et TYSHTCHENKO (1961) ont montré que le GABA (10^{-2} M) a un effet dépressif sur l'activité électrique ganglionnaire de la chenille de *Dendrolimus pini* . Il en est de même pour les décharges des grandes fibres T chez le Criquet *Gampsocleis buergeri* , qui sont inhibées par le GABA appliqué à la concentration de 10^{-2} g/ml sur le ganglion prothoracique (SUGA et KATSUKI, 1961).

Chez *Periplaneta americana* , MILBURN et ROEDER (1960 et 1962) ne peuvent mettre en évidence la moindre action du GABA à 10^{-3} M sur l'activité du nerf phallique, activité résultant de la levée d'une inhibition induite au moins au niveau du ganglion sous-oesophagien. Il en est de même pour HODGSON et WRIGHT (1963) qui ne dénotent aucun effet du GABA (même à 10^{-3} M) sur le système " fibres cercales-fibres géantes " (ganglion dégainé). Cependant,GAHERY et BOISTEL (1965) réussirent à bloquer complètement la transmission du même système par le GABA à forte concentration (10^{-2} g/ml). Aucune inhibition n'est visible à 10^{-3} g/ml,tandis qu'elle est partielle à 5.10^{-3} g/ml. Ces résultats ont été confirmés par SITTLER et DE REMER (1966).

La membrane des corps cellulaires périphériques du ganglion A_6 est également sensible au GABA (KERKUT, PITMAN et WALKER, 1969 a et b; PITMAN et KERKUT, 1970). Sous l'action d'injections microélectrophorétiques de GABA, les cellules s'hyperpolarisent tandis que l'amplitude de la réponse est proportionnelle à la quantité de GABA injecté. Le seuil de réponse a été évalué par extrapolation à $1,05 \cdot 10^{-13}$ M. Le potentiel d'inversion du PPSI obtenu par stimulation du nerf génital ou des connectifs antérieurs est de $- 78,9 \pm 2,1$ mV et le potentiel d'inversion du potentiel au GABA est de $- 75,4 \pm 0,6$ mV.

Le PPSI et le potentiel au GABA seraient tous les deux liés à une augmentation de la perméabilité de la membrane des corps cellulaires aux ions Cl^- et un peu aux ions K^+.

En outre, le PPSI et le potentiel au GABA sont tous les deux réduits ou même bloqués par la picrotoxine appliquée à la concentration de 10^{-4} g/ml. Il est en effet reconnu par de nombreux auteurs que la picrotoxine aurait un effet inhibiteur spécifique des synapses au GABA chez les Invertébrés et en particulier des synapses neuromusculaires des Insectes (USHERWOOD et GRUNDFEST, 1965). Nous aurons l'occasion de revenir sur cette question (voir p.270). KERKUT, PITMAN et WALKER (1969 a et b) concluent que le GABA serait le médiateur inhibiteur dans le SNC des Insectes.

Certains autres acides aminés, tels le glycocolle (ou glycine), les acides glutamique et aspartique, ont été retenus comme candidats médiateurs, en particulier chez les Vertébrés (voir revue par HEBB, 1970). Nous avons déjà dit que chez les Insectes, le glutamate serait le médiateur excitateur à la jonction neuromusculaire (voir p. 48). La glycine a un effet inhibiteur au niveau de certains corps cellulaires du ganglion A_6 de *Periplaneta americana* (KERKUT, PITMAN et WALKER, 1969 b) mais à des doses 10 à 100 fois plus fortes que pour le GABA.

Il résulte de ces diverses expériences que nous avons de bonnes raisons d'accorder au GABA un rôle possible comme médiateur inhibiteur dans le ganglion A_6. Nous verrons ce qu'il en est, en particulier au niveau des fibres géantes.

3 - CATECHOLAMINES.

Chez les Insectes, ces substances sont surtout localisées dans les corpora cardiaca. Certains auteurs ont pensé qu'elles pouvaient avoir un rôle dans le SNC car les extraits de corpora cardiaca ont des effets marqués sur le SNC de *Periplaneta americana* . (OZBAS et HODGSON, 1958; MILBURN, WEIANT et ROEDER, 1960; MILBURN et ROEDER, 1962; HODGSON, 1962).

Rappelons notamment les expériences de MILBURN, WEIANT et ROEDER (1960) suscitées par celles de OZBAS et HODGSON (1958). Elles sont basées sur les observations de ROEDER, TOZIAN et WEIANT (1960), à savoir que l'activité motrice du nerf phallique est inhibée in situ par le ganglion sous-oesophagien. Elles démontrent que les extraits de corpora cardiaca suppriment l'action de ce centre inhibiteur en mimant les effets de la section de la chaîne, c'est-à-dire en augmentant l'activité électrique sur le nerf phallique. Il devrait par conséquent y avoir une corrélation entre la diminution d'activité sur la chaîne (sous l'action des extraits ou de la section) et l'augmentation d'activité sur le nerf phallique. MILBURN, WEIANT et ROEDER (1960) n'ont pas pu mettre en évidence de façon claire de tels changements réciproques. Ces auteurs ont par contre montré que les extraits de corpora cardiaca n'ont pas d'effets significatifs sur les synapses entre les fibres cercales et les fibres géantes.

Selon des méthodes chromatographiques et pharmacologiques, certaines substances actives extraites des corpora cardiaca peuvent apparaître virtuellement identiques à l'adrénaline ou la noradrénaline (BARTON - BROWNE, DODSON, HODGSON et KIRALY, 1961). Il était donc tout naturel de tester ces deux substances sur le SNC. TWAROG et ROEDER (1957) et HODGSON et WRIGHT (1963), notèrent que l'adrénaline à forte concentration (10^{-4} à 10^{-3} M) facilite, puis bloque l'activité des fibres géantes par application sur le ganglion A_6 dégainé de *Periplaneta americana* , tandis que l'activité efférente (motrice) de ce même ganglion n'est pas affectée (MILBURN et ROEDER, 1960 et 1962). La noradrénaline, dans les mêmes conditions, a moins d'effets. HODGSON et WRIGHT (1963) confirment ces divers effets en les précisant par des études intracellulaires. Par microélectrodes introduites dans les fibres géantes, ils montrent que l'excitabilité de ces fibres

n'est pas affectée, et concluent que le site d'action de l'adrénaline est au niveau synaptique .

Ces résultats dénotent une action neurologique significative de ces diverses substances, mais ils ne permettent pas de retracer un parallèle complet avec ceux obtenus par les extraits de corpora cardiaca car ceux-ci, d'après MILBURN, WEIANT et ROEDER (1960), n'ont aucun effet sur le système " fibres cercales-fibres géantes ".

La dopamine (= 3-hydroxytyramine = 3, 4-dihydroxyphényléthylamine) à la concentration de 5.10^{-5} g/ml a, semble-t-il une action importante sur le ganglion A_6 de *Periplaneta americana,* en déclenchant des bouffées d'activité enregistrables en différents endroits de la chaîne ventrale (MILBURN et ROEDER, 1960 et 1962; GAHERY et BOISTEL, 1965). GAHERY et BOISTEL (1965) déduisent de leurs expériences que cette substance n'a aucune action sur le système " fibres cercales - fibres géantes" .

L'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine (5.10^{-5} g/ml) dépolarisent et excitent certains corps cellulaires du ganglion A_6 (KERKUT, PITMAN et WALKER, 1969 b).

Les diverses expériences rapportées ci-dessus démontrent le rôle joué par ces trois catécholamines au niveau du ganglion A_6 de *Periplaneta americana* sans pourtant affecter d'une manière certaine le système " fibres cercales - fibres géantes ". Une telle étude serait souhaitable et pourrait être entreprise en utilisant la technique de la " fibre isolée ".

4 - SEROTONINE (= 5-hydroxytryptamine)

Cette indolamine s'est montrée inefficace sur l'activité du nerf phallique, même à une concentration de 10^{-3} M (MILBURN et ROEDER, 1962) et sur le système " fibres cercales - fibres géantes " à la même concentration (HODGSON et WRIGHT, 1963). Cependant,le rôle de cette substance dans le fonctionnement du SNC est très important . Chez les Invertébrés, elle est tantôt excitatrice, tantôt inhibitrice.

Certains auteurs lui accordent un rôle de médiateur chimique, par exemple chez l'Escargot (GERSCHENFELD et STEFANI, 1965).

Chez *Periplaneta americana* , elle se trouve en assez grande quantité dans les corpora cardiaca (COLHOUN, 1963 a), aussi n'est-il pas impossible que ces glandes endocrines aient un rôle modulateur sur le SNC. Récemment, JEGO, JOUAN et BOISTEL (1970), ont montré que la sérotonine, sous forme de sérotonine-base, a une action très nette sur le ganglion A_6 . Pour une concentration allant jusqu'à 10^{-3} g/ml, l'activité au niveau des connectifs augmente puis se transforme en bouffées de plus en plus longues à mesure que la sérotonine agit. Au niveau des nerfs cercaux X, ces mêmes auteurs ont noté que,selon la concentration, l'action de la sérotonine était différente. De 10^{-8} à 10^{-7} g/ml, elle est excitatrice tandis qu'elle est inhibitrice pour des concentrations plus fortes (jusqu'à 10^{-3} g/ml), confirmant les résultats précédents de UNGER (1965). Par contre,la sérotonine créatinine sulfate, utilisée sous cette forme par de nombreux auteurs, n'a aucune action sur l'activité du ganglion A_6 . Le 5-hydroxytryptophane, précurseur de la sérotonine, n'exerce aucune action nette sur le ganglion. Chez les Vertébrés, la sérotonine est normalement métabolisée par désamination oxydative. L'enzyme qui catalyse cette réaction est une monoamine-oxydase (MAO). JEGO, JOUAN et BOISTEL (1970) ont cependant observé qu'un inhibiteur de la MAO (niamide) ne favorise pas l'action de la sérotonine.

Ainsi,au niveau du ganglion A_6, les systèmes enzymatiques permettant la synthèse et la destruction de la sérotonine, ne sont pas visiblement actifs, s'ils sont présents. JEGO, JOUAN et BOISTEL (1970) en concluent que la sérotonine ne semble pas jouer un rôle important en tant que médiateur chimique dans ce ganglion. Certaines expériences de ces auteurs tendent à montrer que la sérotonine agirait sur la membrane postsynaptique, d'une manière non spécifique .

Des expériences effectuées sur des corps cellulaires de ce même ganglion (JEGO et BOISTEL, 1970) montrent qu'au niveau membranaire, la sérotonine perturbe les mécanismes ioniques (calciques et potassiques) impliqués dans le maintien de la stabilité membranaire et dans le développement du potentiel d'action.

CONCLUSION

En résumé, il apparaît nettement que la plupart des renseignements concernent la Blatte, *Periplaneta americana* et se rapportent bien souvent au ganglion A_6, mais que le portrait de la transmission synaptique chez les Insectes reste très incomplet.

Sur le plan ultrastructural les travaux sont peu nombreux. Ils sont essentiellement représentés par ceux de SMITH et TREHERNE (1963) et FARLEY et MILBURN (1969).

Sur le plan fonctionnel, les techniques électrophysiologiques et pharmacologiques ont fourni des résultats très nombreux mais cependant peu propices à une utilisation rationnelle. Il semble que la technique de la micro-électrode ait atteint les limites de son champ d'action tout au moins dans le domaine des mécanismes fondamentaux de la transmission synaptique. Il est également évident que les succès de la pharmacologie lui sont plus ou moins étroitement liés. C'est peut- être vers des techniques histochimiques nouvelles et précises, associées à la biochimie moléculaire, qu'il faut porter son effort.

L'enregistrement à l'échelon cellulaire des mécanismes électriques accompagnant la transmission synaptique est encore à ses débuts. Seuls les travaux de BENTLEY (1969 a et b) et CALLEC et BOISTEL (1966 a et b, 1967) ont apporté quelque lumière à ce sujet. De l'ensemble des travaux exposés, il ressort qu'un effort considérable a été fait pour identifier en particulier le médiateur chimique qui serait impliqué dans le système " fibres cercales - fibres géantes ". Afin de faire le point sur la question, il serait bon de récapituler les critères d'identification déjà acquis et de les intégrer dans la liste complète des critères établie par de nombreux auteurs (CURTIS, 1961, 1970; FLOREY, 1961; Mac LENNAN, 1963; TREHERNE, 1966; WERMAN, 1966; GERSCHENFELD, 1966; HEBB, 1970). Nous avons choisi la liste donnée par GERSCHENFELD (1966) car elle s'adresse plus particulièrement aux Invertébrés et est relativement récente.

CRITERES D'IDENTIFICATION DES SYNAPSES CHIMIQUES ET DES MEDIATEURS CHEZ LES INVERTEBRES (GERSCHENFELD, 1966)

A - CRITERES DE RECONNAISSANCE D'UNE SYNAPSE CHIMIQUE.

1 - Physiologiques.

a) absence de couplage électrique entre les régions pré et postsynaptiques.
b) inexcitabilité électrique de la membrane postsynaptique.
c) existence d'un potentiel d'inversion pour les potentiels postsynaptiques.

2 - Ultrastructuraux.

Existence d'une structure synaptique comprenant : vésicules présynaptiques, épaississements particuliers à la fois au niveau des membranes pré et postsynaptiques, fente synaptique bien développée et absence de jonctions serrées entre les membranes pré et postsynaptiques.

B - CRITERES DE RECONNAISSANCE D'UNE SUBSTANCE COMME MEDIATEUR CHIMIQUE.

1 - Présence et stockage de la substance sous forme liée dans:

a) des vésicules synaptiques,
b) des terminaisons synaptiques,
c) des fibres nerveuses,
d) le ganglion entier.

2 - Présence d'un système enzymatique synthétiseur de la substance dans:

a) des vésicules synaptiques,
b) des terminaisons synaptiques,
c) des fibres nerveuses,
d) le ganglion entier.

3 - Présence d'un système enzymatique inactivateur de la substance dans:

a) la région synaptique,
b) le ganglion entier.

(ce critère peut être complété ou remplacé par le n°7)

4 - Collectabilité de la substance après stimulation nerveuse.

(ce critère peut être remplacé par 1 a et 1 b)

5 - Existence de sites récepteurs pour la substance dans la cellule postsynaptique:

a) désensibilisation croisée entre la substance et le médiateur naturel,
b) blocage des sites récepteurs du médiateur par des substances compétitives antagonistes des récepteurs à la substance,
c) effets de microinjections de la substance sur la membrane de la cellule postsynaptique (complétée par 6d).

6 - Identité d'actions physiologiques induites à la fois par la substance et le médiateur:

a) changements de perméabilité ionique spécifiques similaires dans la membrane postsynaptique,
b) potentiels d'inversion similaires,
c) la substance doit modifier la résistance membranaire,
c') des drogues inhibant le système enzymatique inactivateur prolongent l'action des deux (critère seulement valable si le point 3 est rempli),
d) changements similaires du potentiel de membrane (complété par 5c),
d') la substance doit agir à des concentrations très faibles.

7 - La substance doit être capable de:

a) diffusion libre,
a') désensibilisation des sites récepteurs,
a'') refixation destinée au stockage.

Dans les paragraphes où les conditions d'un critère sont classées avec la même lettre (a, a' ....), ces conditions peuvent être interchangeables ou valables simultanément.
Dans les cas où il y a une série de conditions de a à n , la condition a représente celle qui est la plus importante, celle qui comprend toutes les autres conditions du même paragraphe. La dernière condition de chaque paragraphe représente le minimum sollicité, digne de susciter des recherches ultérieures.

Les résultats actuellement disponibles tendent à montrer que les relations synaptiques entre les fibres afférentes d'origine cercale et les fibres géantes, dans le neuropile du ganglion A_6 de *Periplaneta americana*, sont de type chimique et que le médiateur excitateur serait l'acétylcholine. Des influences inhibitrices ont également été mises en évidence (CALLEC et BOISTEL, 1966 b; voir aussi p.37), mais nous ne possédons aucune indication sur la nature du médiateur possible. Cependant, la sensibilité particulière de la membrane de certains corps cellulaires vis-à-vis du GABA (KERKUT, PITMAN et WALKER, 1969 a et b ; PITMAN et KERKUT, 1970) et la présence de cet acide aminé dans la chaîne ventrale (RAY, 1964 et 1965) prédisposent à le considérer en tout premier lieu comme candidat possible.

Les données acquises concernent dans leur grande majorité le système cholinergique. Nous allons regrouper celles qui peuvent concerner avant tout le système " fibres cercales-fibres géantes " selon le classement des critères élaboré par GERSCHENFELD (1966).

Critères de reconnaissance d'une synapse chimique.

1 - Physiologiques : néant

2 - Ultrastructuraux : l'existence de structures synaptiques comprenant tous les critères définis a été démontrée dans le ganglion A_6 par SMITH et TREHERNE (1963) et pour le système " fibres cercales- fibres géantes " en particulier par FARLEY et MILBURN (1969).

Critères de reconnaissance d'une substance comme médiateur chimique.

1 d - Présence d'ACh dans le ganglion A_6 entier (COLHOUN, 1958 c)

2 d - Présence de cholineacétylase dans le ganglion A_6 entier (COLHOUN, 1958 a).

3 a - Présence d'une estérase sensible à l'ésérine dans la région synaptique (SMITH et TREHERNE, 1963).

4 - Collectabilité possible de l'ACh sur le ganglion ésériné (MIKALONIS et BROWN, 1941 ; COLHOUN, 1958 d).

5 b - La d-tubocurarine et l'atropine (10^{-7} à 10^{-5} M) bloquent la

transmission entre les fibres cercales et les connectifs antérieurs (SHANKLAND, ROSE et DONNIGER, 1971). Ces connectifs comprennent notamment les fibres géantes.

6 c' - L'ésérine prolonge le PPSE enregistré par électrodes externes sur le connectif antérieur entier (YAMASAKI et NARAHASHI , 1960). Ce PPSE ne correspond pas uniquement aux fibres géantes.

7 - La présence d'une grande quantité de cholinestérase s'oppose à la diffusion libre de l'ACh.

La plupart des critères incomplets ou manquants sont dus à l'absence de tout contrôle possible des paramètres membranaires des éléments pré-et postsynaptiques. Nos efforts ont tendu à combler, autant que faire se peut, cette lacune.

Deuxième partie

Chapitre I

Données anatomiques sur le système "récepteur cercaux-fibres cercales-fibres géantes" chez *Periplaneta americana.*

A - LES CERQUES ET LES RECEPTEURS CERCAUX.

Les cerques de la Blatte adulte sont composés de 16 à 18 segments chez le mâle et de 12 à 13 segments chez la femelle. Chaque cerque (fig.9 A) possèderait, selon les récentes estimations de MILBURN et BENTLEY (1971), 650 à 750 sensilles dont environ 70 sensilla campaniformia (1). La grande majorité est représentée par des sensilla trichodea qui, d'après l'aspect de leurs processus externes (soies), peuvent se subdiviser essentiellement en deux groupes: l'un constitué de sensilles courtes et trapues, de couleur brun foncé (5 à 600) et l'autre, rassemblant des soies très fines, plus ou moins longues, d'aspect plus clair (90 à 110) (voir quelques exemples dans la fig. 9 B et D). Les soies les plus longues peuvent atteindre 700 µm et 6 µm de diamètre à la base.

(1) Un examen rapide au microscope à balayage ne nous a pas permis d'observer de sensilla campaniformia. Par contre il est assez fréquent de rencontrer des sensilla trichodea trapues (fig. 10 A) ou fines (fig. 10 B) qui ont perdu leurs soies. Dans le premier cas, elles laissent apparaître un trou, tandis que dans le second cas, si la cassure est très près de la surface, elles peuvent laisser croire, à un plus faible grossissement, à des sensilla campaniformia.

Ces soies appartiennent essentiellement à des mécanorécepteurs dont les fibres sensitives de petit diamètre (moins de 0,5 µm pour la plupart) forment le nerf cercal sensitif XI (fig. 11 A), selon la terminologie de ROEDER, TOZIAN et WEIANT (1960), (nerf 8 de GUTHRIE et TINDAL (1968). Certaines fibres sensitives cercales empruntent également le nerf X. En fait, la littérature est extrêmement pauvre en renseignements sur l'innervation précise des cerques et de la région postérieure de l'abdomen, du moins chez cette espèce.

MILBURN et BENTLEY (1971) ont dénombré environ 1000 fibres dans le nerf X et près de 2500 dans le nerf XI. Compte-tenu du fait qu'il n'y a que 650 à 750 sensilles, cela suppose, selon ces auteurs, que de nombreux récepteurs possèdent plusieurs cellules sensorielles ou que chaque cellule sensorielle se subdivise en plusieurs branches. En fait, ces auteurs n'ont pas comptabilisé de nombreux récepteurs situés à la base des cerques, en particulier sur les zones cuticulaires qui les séparent et ne semblent pas avoir tenu compte de la fonction en partie motrice du nerf X (GAHERY et BOISTEL, 1966). Il apparaît donc indispensable qu'une étude sérieuse et complète soit entreprise sur cette région. Ces fibres pénètrent ensuite dans le ganglion A_6 où elles établissent des contacts synaptiques sur l'arbre dendritique des fibres géantes (voir plus loin).

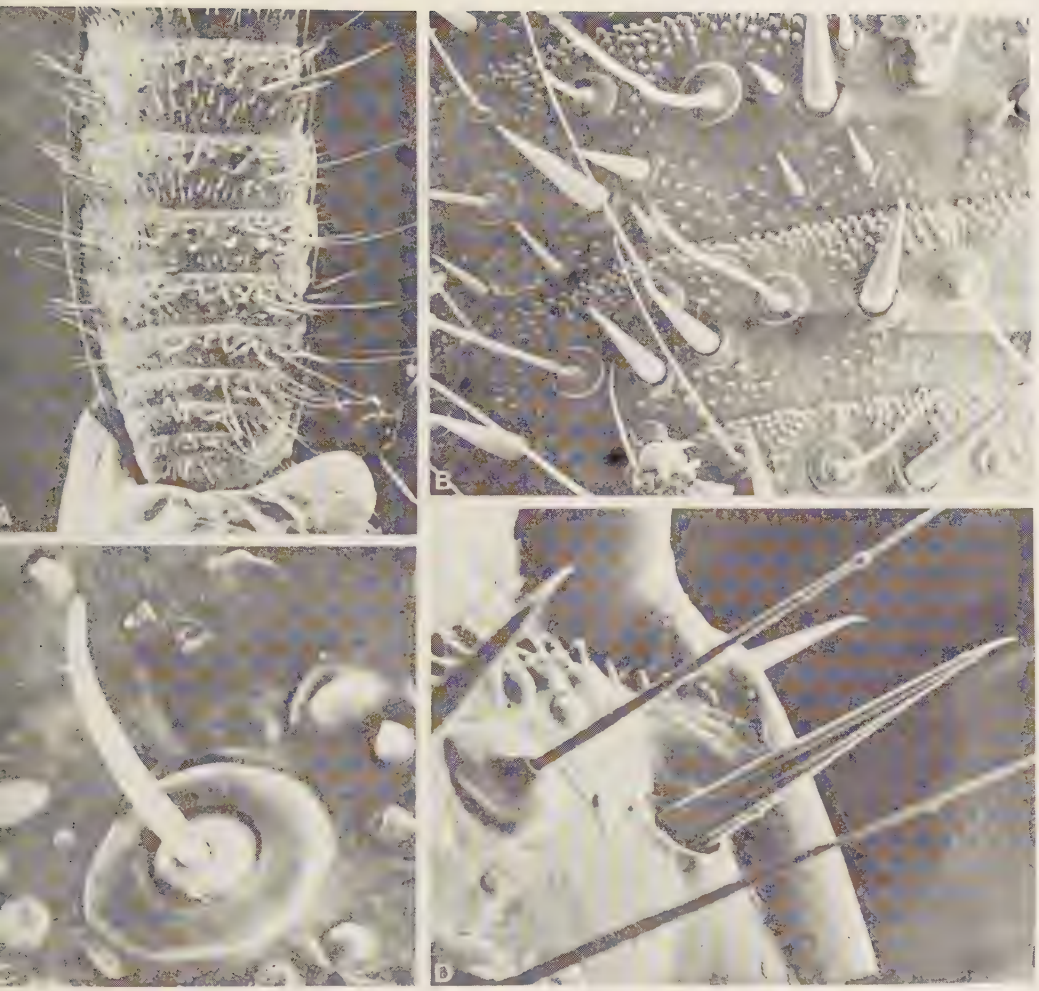


Fig. 9 - Microphotographies de la face ventrale d'un cerque de *Periplaneta americana* mâle adulte (photos obtenues à l'aide d'un microscope à balayage JEOL).

A : Moitié basale du cerque gauche sur laquelle se situent tous les mécanorécepteurs que nous avons décelés en relation avec la fibre géante médio-ventrale. Noter la segmentation du cerque et la diversité des soies externes. x 60.

B : Observer les soies les plus longues et les plus fines (mécanorécepteurs toniques) côtoyant des soies fines mais 3 à 4 fois plus courtes (mécanorécepteurs phasico-toniques ou phasiques) et des soies courtes et trapues (mécanorécepteurs phasiques). x 300.

C - Gros plan sur la soie et l'embase d'un mécanorécepteur phasico-tonique. x 2000.

D - Soies phasico-tonique et phasique proches de la bordure interne du cerque. Noter la différence entre les deux embases. En particulier, le logement qui reçoit la base trapue ne facilite le déplacement de la soie que dans un seul sens. x 900.

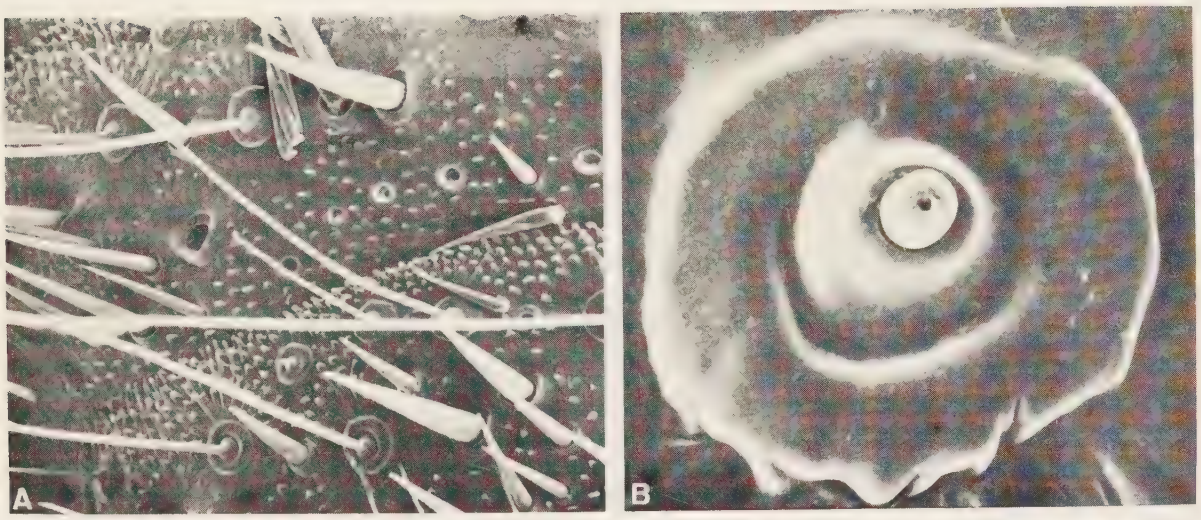


Fig. 10 - Microphotographies de la face ventrale d'un cerque de *Periplaneta americana* mâle adulte (même préparation que celle de la fig. 9).

La photo A montre plusieurs logements de soies trapues vides. Ces trous ne doivent pas être confondus avec d'éventuels pores à sensibilité chimique. x 300.

B : Embase de mécanorécepteur tonique ayant perdu sa soie et qui pourrait être confondue avec une sensilla campaniformia. x 3000.

B - LES FIBRES GEANTES.

Nous avons voulu isoler dans un deuxième paragraphe les traits propres aux fibres géantes dans le ganglion A_6 .

1 - Aux niveaux abdominal et thoracique (ganglion A_6 mis à part)

L'un des traits les plus frappants du système nerveux abdominal de la Blatte est,sans contestation possible,la présence d'un certain nombre d'interneurones appelés " fibres géantes ", dont le diamètre atteint au maximum 50 µm. Nous avons dit dans les chapitres précédents que ces fibres géantes ont été l'objet de nombreuses études visant à préciser leur rôle possible chez l'animal vivant.

Malgré des travaux très récents ayant permis une meilleure compréhension de ce système, notre connaissance à ce sujet reste très incomplète. En particulier, nous ne sommes pas encore en possession d'éléments suffisamment convaincants pour affirmer ou non si elles jouent un rôle direct dans le réflexe de fuite,et par conséquent si elles sont directement en contact synaptique avec les motoneurones des appendices locomoteurs au niveau des ganglions thoraciques.

Comme l'a déjà montré HESS (1958 b), le nombre, la position et la taille des fibres géantes abdominales subissent quelques variations. Avec ROEDER (1948 a) on peut cependant les séparer en deux groupes :

un groupe ventral formé par les trois fibres les plus larges (40 à 50 µm en diamètre) associées à une fibre de plus petit diamètre (25 µm);

un groupe dorsal comprenant 3 fibres ou plus de 20 à 25 µm de diamètre et une ou plusieurs fibres plus petites (voir fig. 11 B).

La continuité des fibres géantes tout au long de la chaîne abdominale n'a jamais posé de problème, tandis qu'au niveau thoracique les auteurs n'ont pas toujours été unanimes. En effet,ROEDER (1948 a) pensait que certaines fibres se terminaient au niveau du ganglion métathoracique (T3).

HESS (1958 b) ne réussit pas à montrer des traces de dégénérescence au-delà de T3 et s'arrêta donc aux mêmes conclusions que ROEDER. Cependant, PIPA, COOK et RICHARDS (1959) n'observèrent aucune interruption des fibres géantes le long du thorax, ce qui a été confirmé par FARLEY et MILBURN (1969) à l'aide d'expériences de dégénérescence.

Des expériences physiologiques et histologiques récentes (SPIRA, PARNAS et BERGMANN , 1969 a et b ; PARNAS, SPIRA, WERMAN et BERGMANN, 1969) ne décrivent aucune interruption entre A_6 et le ganglion sous-oesophagien. Le diamètre des fibres serait maximum au niveau T3 et diminuerait ensuite progressivement de T3 au ganglion sous-oesophagien (7 µm). Au niveau de chaque ganglion abdominal et thoracique, les fibres subissent une constriction (fig. 11 E.). Le diamètre passe ainsi à 20 µm et même moins, ce qui a pour effet de diminuer momentanément la vitesse de conduction et qui a pu faire croire à un délai synaptique. Ces " isthmes ", associés à une diminution progressive du diamètre des fibres géantes vers la tête de l'animal, permettraient d'expliquer, selon PARNAS, SPIRA, WERMAN et BERGMANN (1969), la vulnérabilité plus grande de la conduction axonique dans le sens antéro-postérieur, en l'absence de synapses. (la conduction est en effet bidirectionnelle pour des stimuli isolés et devient souvent unidirectionnelle pour des stimulations répétitives). Dans le sens antéro-postérieur, la surface de membrane offerte au potentiel d'action, à la sortie d'un isthme, est plus importante que dans le sens contraire. Ce phénomène est bien connu au niveau " segment initial - corps cellulaire " des motoneurones spinaux (COOMBS, CURTIS et ECCLES, 1957 a et b).

DAGAN et PARNAS (1970) ont trouvé que les fibres géantes n'ont pas d'action directe sur les motoneurones thoraciques au cours du réflexe de fuite, ce qui est en contradiction avec les travaux précédents et notamment ceux de ROEDER (1948 a). Ils pensent que ce rôle est dévolu à un système d'axones plus petits ayant une vitesse de conduction de 1,5 à 3,5 m/s (les fibres géantes ayant une vitesse de conduction voisine de 6 m/s). L'activation des fibres géantes aurait pour effet, selon ces mêmes auteurs, de commander les mouvements d'orientation des antennes simultanément ou légèrement plus tôt que le mouvement des pattes. Il s'agirait là de la mise en jeu, par les antennes, d'un système de " coordination - orientation " précédant de peu la fuite de l'animal.

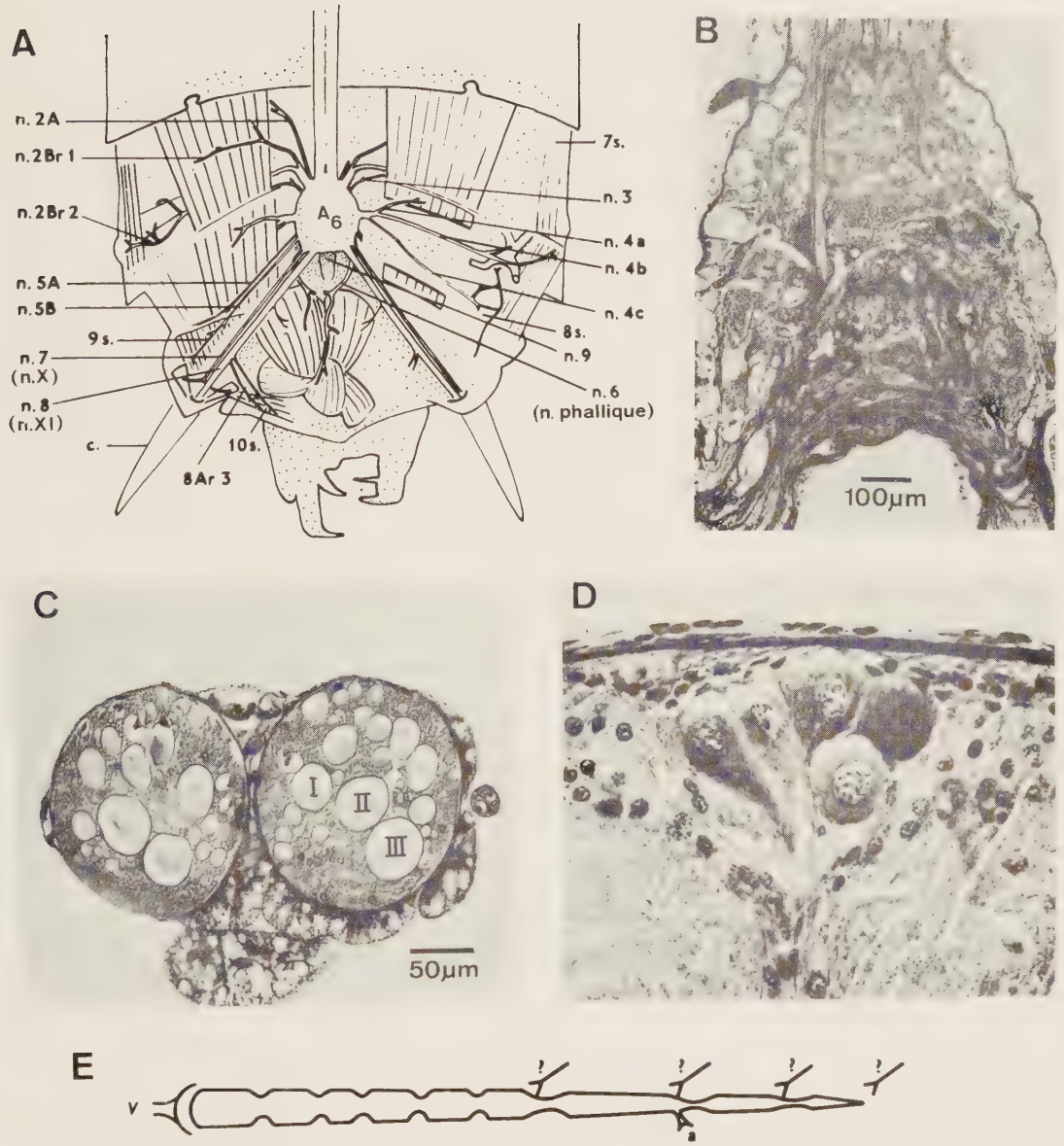


Fig. 11 - A - Le ganglion A_6 de *Periplaneta americana* et ses différents nerfs (vue dorsale d'un spécimen mâle adulte). 7s. à 10s., septième au dixième segment; n.2 à n.9, nerfs numérotés de 2 à 9. n.7 et n.8 correspondent respectivement aux nerfs X et XI de ROEDER, TOZIAN et WEIANT (1960); c., cerque. D'après GUTHRIE et TINDALL (1968).

B - Coupe horizontale médiane dans le ganglion A_6. Noter les corps cellulaires périphériques et le neuropile central, ainsi que le point de départ des connectifs antérieurs (en haut) et des nerfs cercaux (en bas de la photo).

C - Coupe transversale des connectifs entre les ganglions A_5 et A_6. Les trois plus grosses fibres du groupe ventral sont numérotées I, II, et III selon HARRIS et SMYTH (1971 b).

D - Portion de coupe transversale dans le ganglion A_6, où l'on reconnaît quelques corps cellulaires excitables de la ligne médio-dorsale (voir fig. 3).

E - Représentation schématique de l'organisation d'une fibre géante du groupe ventral. Elle pourrait donner des ramifications présynaptiques sur les motoneurones thoraciques (a) et, outre les afférences cercales au niveau A_6, elle pourrait recevoir diverses afférences au niveau thoracique (marquées par des points d'interrogation). Noter le rétrécissement que subit la fibre au passage de chaque ganglion de la chaîne ventrale. D'après PARNAS, SPIRA, WERMANN et BERGMANN (1969).

D'autres faits tendent à compliquer encore les choses. PARNAS, SPIRA, WERMAN et BERGMANN (1969) rapportent que certaines fibres géantes pourraient répondre à la stimulation des antennes, démontrant ainsi la possibilité d'une conduction bidirectionnelle chez l'animal vivant . La stimulation des antennes peut également déclencher le réflexe de fuite (MAYNARD, 1956). Cet auteur postulait une connexion directe entre le nerf antennaire et des fibres géantes descendantes à partir du deutocérébron.

Le problème de la fonction des fibres géantes semble , comme on peut le remarquer, assez loin d'être résolu, d'autant plus que certains auteurs ont montré la présence de branches latérales (collatérales) au niveau de certains ganglions thoraciques et abdominaux. Sur des coupes longitudinales du ganglion métathoracique, FARLEY et MILBURN (1969) ont interprété que ces collatérales pouvaient s'articuler directement sur les motoneurones des pattes . Par injection de jaune procion dans les plus grosses fibres du groupe ventral, HARRIS et SMYTH (1971 b) ont montré que chacune d'elles possède au moins une branche collatérale dans la région centrale de chaque ganglion abdominal et plus rarement au niveau des ganglions thoraciques. Ces branches sont très fines à l'endroit même ou elles quittent l'axone géant et sont de ce fait très difficiles à repérer sur les coupes histologiques. Ces collatérales s'enroulent principalement à la surface d'autres fibres assez larges et présentent de place en place, au contact de ces fibres, de petits élargissements qui se remplissent de colorant. Ces structures rappellent celles des boutons terminaux et seraient probablement, selon HARRIS et SMYTH, des terminaisons présynaptiques.

Ces faits objectivent incontestablement des relations entre les fibres géantes et d'autres axones aux niveaux abdominal et thoracique. Ces travaux ne sont cependant qu'à leur début et nécessitent en particulier une confirmation physiologique ,ce qui pourrait être fait par exemple, en enregistrant simultanément dans des motoneurones thoraciques et des fibres géantes.

2 - Au niveau A_6

La section des connectifs entre A_5 et A_6 entraîne une dégénérescence antérieure de tous les axones géants bien qu'ils ne dégénèrent pas exactement en même temps et à la même vitesse sur toute leur longueur (FARLEY et MILBURN, 1969). Ces résultats confirment et complètent les expériences antérieures de ROEDER (1948 a) et de HESS (1958 b). Il en résulte que les corps cellulaires de toutes les fibres géantes sont au niveau A_6.

L'injection de jaune procion a pu être pratiquée entre A_5 et A_6 ; elle a permis la coloration de certaines fibres géantes dans ses moindres détails dans le neuropile de A_6 . Ces résultats ont été obtenus simultanément et séparément dans deux laboratoires américains différents par MILBURN et BENTLEY (1971) d'une part et par HARRIS et SMYTH (1971 b), d'autre part.

Les premiers auteurs ont obtenu des résultats positifs sur deux fibres correspondant aux fibres II et III (communication personnelle)(voir fig.11). HARRIS et SMYTH ont injecté le colorant dans les fibres I et II . En somme les trois fibres géantes I, II, III du groupe ventral ont été étudiées par ces différents auteurs. Une comparaison est possible pour la fibre II. Cela est d'autant plus intéressant que tous les résultats présentés dans ce mémoire, se rapportent à cette fibre, ce qui offre un support anatomique d'un intérêt considérable à nos expériences électrophysiologiques et pharmacologiques.

La fibre II décrite par MILBURN et BENTLEY (1971) se divise dans la moitié homolatérale de A_6 en plusieurs branches principales, elles-mêmes se subdivisant en branchioles de plus en plus petites; le point de convergence de toutes ces branches se situe latéralement, approximativement à 50 µm du centre du ganglion (fig. 12 A). L'ensemble forme ce qu'il est convenu d'appeler un "arbre dendritique"(1) extrêmement touffu sur lequel peuvent s'établir de très nombreux contacts synaptiques et notamment ceux des fibres cercales. Au confluent de la plupart des branches dendritiques se situe un segment axonique épais et court qui se rétrécit antérieurement et puis s'élargit progressivement pour former l'axone géant. Il pourrait correspondre au segment pénétrable par la microélectrode (voir p.32) et que nous appellerons " segment intégrateur " . Les branches dendritiques les plus fines révèlent de minces lisérés fluorescents qui se recourbent et s'entortillent dans le neuropile montrant parfois une conformation hélicoïdale.

(1) Traduction littérale de l'expression anglaise " dendritic tree ".

De place en place, on peut observer de petites varicosités remplies de colorant. Il est possible qu'il s'agisse de boutons postsynaptiques dont le nombre est très élevé. Les dimensions du ganglion considéré dans cet exemple sont, après fixation, de 465 µm en longueur, 411 µm en largeur et 320 µm en épaisseur tandis que le champ dendritique de la fibre II s'étend, respectivement sur 320, 154 et 255 µm. Autrement dit, un tiers environ du neuropile est envahi par cet arbre dendritique. Bien que ce dernier soit confiné d'un seul côté du neuropile, deux processus traversent la ligne médiane. Le prolongement le plus postérieur (P 1), relativement épais, possède peu de branchioles latérales et se termine brusquement juste au-delà de la ligne médiane. Selon MILBURN et BENTLEY, ces prolongements, par analogie avec une configuration semblable chez *Lombricus* (MULLONEY, 1970), pourraient permettre une communication (peut-être par jonction électrique) entre des fibres géantes contralatérales. Le prolongement le plus antérieur (P_2) traverse de part en part le ganglion et est relié à un seul corps cellulaire contralatéral de petites dimensions (14 µm).

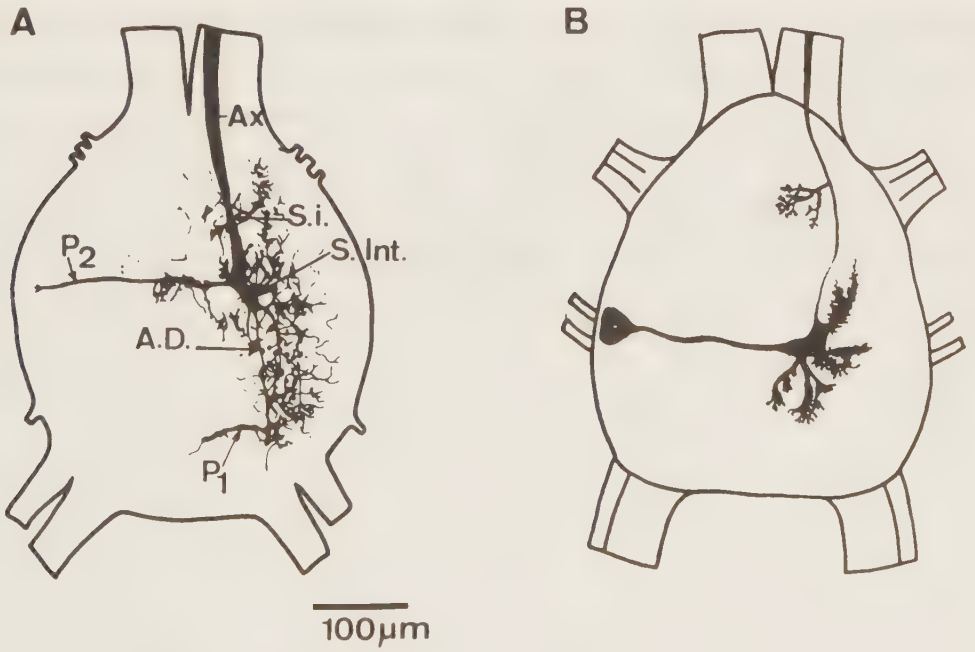


Fig. 12 - Détails structuraux de la fibre géante médio-ventrale (fibre II) dans le ganglion, A_6 de *Periplaneta americana*.
A - D'après MILBURN et BENTLEY (1971).
B - D'après HARRIS et SMYTH (1971 b).
A.D.,"arbre dendritique"; Ax, Axone géant; P_1, Segment distal; P_2, Segment axonique en relation avec le corps cellulaire contralatéral; S.i., Site d'initiation des influx; S.Int., Segment intégrateur (voir conclusion générale).

L'arbre dendritique de la fibre III est plus petit et concentré dans un quart postérieur du ganglion. Il ne possède pas de branches latérales dans la partie antérieure du ganglion, comme c'est le cas pour la fibre II. On note également deux prolongements contralatéraux et sans doute un seul corps cellulaire. HARRIS et SMYTH (1971 b) ont également observé un seul corps cellulaire pour les fibres I et II. Il semble donc probable que les trois plus grosses fibres appartenant au groupe ventral (I, II, III) ne possèdent chacune qu'un seul corps cellulaire. Ces résultats sont en contradiction avec les données acquises aux microscopes optique (ROEDER, 1948 a) et électronique (FARLEY et MILBURN, 1969). Ils montraient qu'au moins certaines fibres des groupes ventral et dorsal provenaient d'une grappe de corps cellulaires. Ce point reste donc à éclaircir et il semble que la technique d'injection au jaune procion le permette, même pour les fibres plus petites du groupe dorsal.

Les résultats de HARRIS et SMYTH (1971 b) corroborent, à quelques détails près, ceux de MILBURN et BENTLEY quant à la morphologie générale, la position de l'arbre dendritique, l'unicité du corps cellulaire et le rétrécissement important entre " l'arbre " et l'axone proprement dit, (fig. 12 B).

En outre, ils signalent dans la partie antérieure de A_6, une branche collatérale supplémentaire qui se ramifie également en branchioles vers une direction médiane, et auxquelles ils accordent une valeur présynaptique comme au passage des ganglions abdominaux et métathoracique .

C - LA JONCTION SYNAPTIQUE.

Afin de pouvoir localiser les terminaisons présynaptiques cercales à l'intérieur du ganglion A_6, FARLEY et MILBURN (1969) opérèrent par dégénérescence ménagée du nerf cercal (section de la moitié caudale du cerque seulement) et étude au microscope électronique.

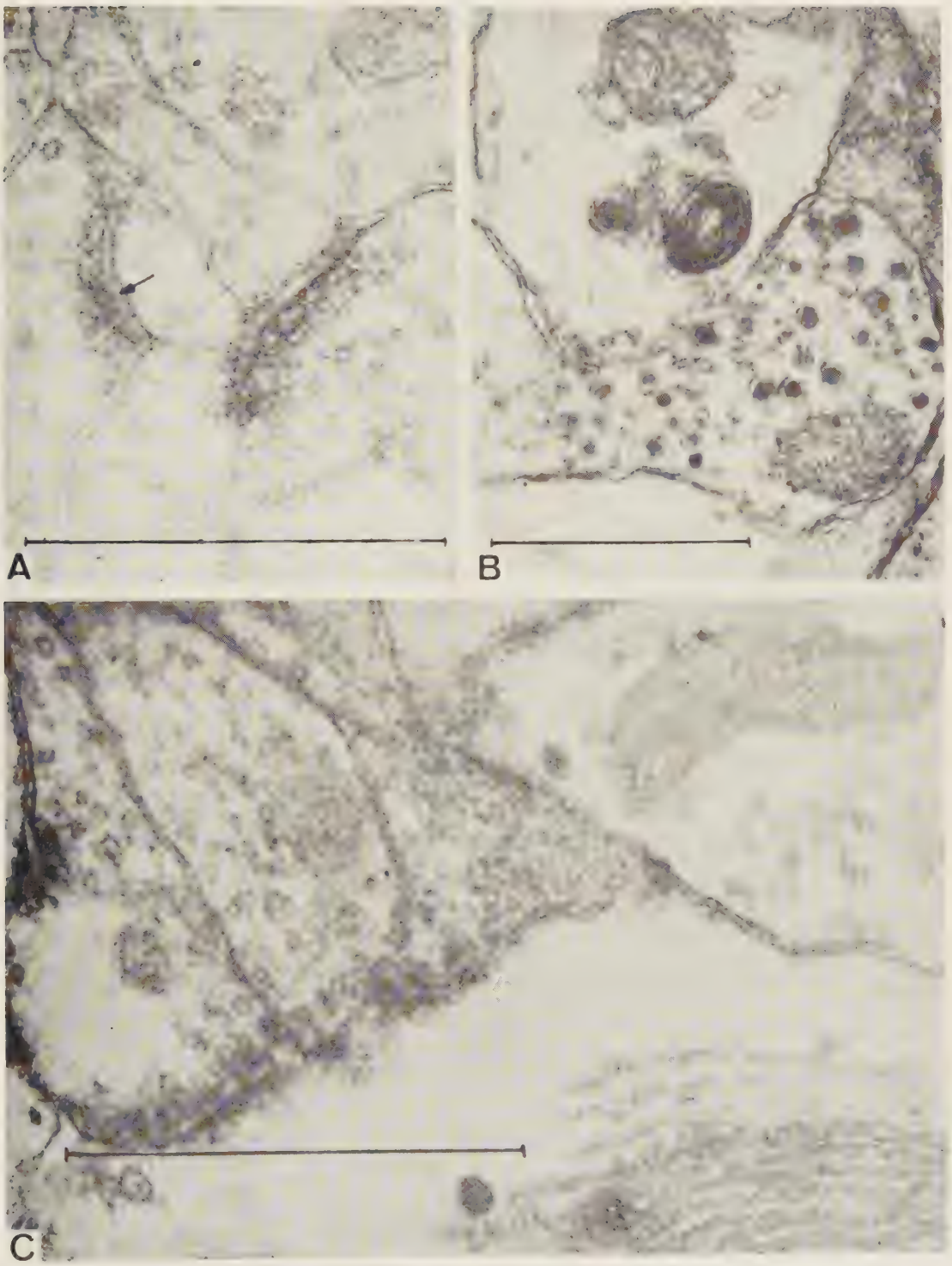
Les fibres cercales au contact des branches dendritiques des fibres géantes se présentent en rangs parfois serrés dont les terminaisons offrent les signes ultrastructuraux classiques de zones synaptiques (fig. 13 C) : des vésicules synaptiques (450 à 550 Å en diamètre), des neurotubules (visibles dans les terminaisons en dégénérescence sous forme de segments courts et irréguliers ayant le même diamètre et la même densité électronique que les vésicules synaptiques), un réseau subsynaptique et un épaississement des membranes pré-et postsynaptiques (fig. 13). FARLEY et MILBURN ont également observé des terminaisons en contact avec des fibres cercales , terminaisons qui contiennent des vésicules plus grandes (900 à 1100 Å) dont le contenu pourrait être un médiateur différent (fig. 13 B). Ces profils particuliers sont souvent en étroite association anatomique avec les terminaisons cercales et n'ont jamais montré de signe de dégénérescence. FARLEY et MILBURN suggèrent qu'ils appartiennent à des interneurones intraganglionnaires pouvant réguler la transmission entre fibres cercales et fibres géantes, Autrement dit , ils pourraient constituer le support anatomique à une facilitation où à une inhibition présynaptique, ce qui nécessite une confirmation physiologique.

Fig. 13 - Microphotographies au microscope électronique relatives au système "fibres cercales-fibres géantes" dans le ganglion A_6 de *Periplaneta americana*.

A - Deux terminaisons sensorielles cercales s'articulent sur une branche appartenant à une fibre géante. Nous observons un épaississement des membranes pré- et post-synaptiques ainsi qu'une lame dense intermédiaire (flèche) et des vésicules synaptiques.

B - Aspect d'une terminaison cercale six jours après section des nerfs cercaux. Elle contient des globules de myéline, des vésicules synaptiques, une mitochondrie et des portions de neurotubules. Elle côtoie une branche appartenant à une fibre géante (visible sur la gauche de la photo). Elles sont toutes deux accompagnées par une terminaison contenant des granules de plus grosse taille susceptibles de contenir un autre type de transmetteur. De telles terminaisons accompagnent fréquemment les synapses entre fibres cercales et fibres géantes.

C - Faisceau de trois terminaisons présynaptiques cercales sur une fibre géante. Chaque échelle représente 1µm. D'après FARLEY et MILBURN (1969).


A
B
C

Chapitre II

La technique "fibre isolée-oil gap" : dissection, mise en place, avantages.

L'analyse des travaux cités dans les chapitres précédents nous a suffisamment montré les nombreuses difficultés rencontrées par l'utilisation des techniques classiques, en particulier de la microélectrode, pour l'enregistrement de l'activité électrique dans le neuropile du ganglion A_6. Nous avons déjà dit en effet que l'absence de corps cellulaires de grande taille et identifiables ne permettait pas d'opérer par exemple comme chez certains Mollusques (Aplysie, Escargot).

Résumons ces difficultés:

- la taille réduite des structures synaptiques neuropilaires ne permet pas de maintenir pendant très longtemps (1 à 2 heures au maximum) la microélectrode en position intracellulaire (il se surajoute en outre un risque important de lésion);
- le repérage exact de la zone interrogée est difficile, d'autant plus que les techniques de marquage ne sont pas aisées à manipuler dans le neuropile (pas d'observation directe possible);
- d'une expérience à l'autre, les résultats obtenus sont difficilement comparables car des expériences répétées sur la même fibre sont quasi impossibles;
- les meilleurs résultats ont été obtenus à l'aide de microélectrodes aussi fines que possible, ce qui entraîne conjointement une augmentation importante de leur résistance électrique. Cette résistance élevée alliée à des capacités parasites (dont celle de la microélectrode) limite la bande passante, surtout

pour les hautes fréquences, et diminue le rapport signal-bruit. L'atténuation du signal qui en résulte peut se compenser par l'utilisation de circuits à capacité négative mais l'amplitude du " bruit de fond " reste telle qu'il est souvent impossible d'observer convenablement des potentiels de faible amplitude (tels les PPSEs et PPSIs unitaires ou d'éventuels potentiels miniatures);

- la stimulation mécanique (des récepteurs par exemple) est rendue extrêmement délicate, de peur d'imprimer le moindre mouvement à la microélectrode par rapport à la préparation;

- cela entraîne également des difficultés pour modifier ou changer le liquide de perfusion (dans le cas d'études ioniques ou pharmacologiques, par exemple);

- dans tous les cas, il y a obligation d'inciser plus ou moins la gaine du ganglion pour livrer passage à la microélectrode .

La plupart de ces difficultés peuvent être surmontées par l'utilisation d'électrodes externes. Déjà YAMASAKI et NARAHASHI (1960), utilisant une telle technique, pouvaient enregistrer un PPSE global entre une électrode placée sur les connectifs, juste à la sortie du ganglion A_6, et une électrode indifférente au contact du ganglion métathoracique. Une version plus raffinée de cette technique utilise un pont de sucrose (" sucrose-gap ") entre les deux électrodes pour réduire le facteur court-circuit. Elle a été récemment appliquée à l'étude du ganglion cervical supérieur du Lapin (KOSTERLITZ et WALLIS, 1966 ; KOSTERLITZ, LEES et WALLIS, 1968 et 1970). Cependant les résultats obtenus restent globaux (c'est-à-dire qu'ils concernent un grand nombre de fibres) et sont loin d'être aussi amples et précis que par la microélectrode intracellulaire.

La mise au point récente d'une technique permettant l'isolement par microdissection de certaines fibres géantes chez *Periplaneta americana*, entre les ganglions A_4 et A_5 (PICHON et BOISTEL, 1966 et 1967), a permis d'envisager l'enregistrement des potentiels postsynaptiques à l'échelon unitaire. Pour cela, il faut demeurer dans les limites de la constante d'espace de ces potentiels (voir p. 110) , autrement dit effectuer la dissection des fibres aussi près que possible du ganglion A_6 . La résistance externe entre les deux extrémités de la portion de fibre isolée est accrue par l'utilisation d'un pont d'huile de paraffine ("oil- gap") (voir PICHON et CALLEC, 1970).

A - DISSECTION D'UNE FIBRE GEANTE.

La préparation comprenant les 2 cerques, les nerfs cercaux X et XI , et la chaîne ventrale abdominale jusqu'au ganglion T_3, est rapidement isolée et posée sur une lame de verre dans quelques gouttes de liquide physiologique. Le système trachéen alimentant le ganglion A_6 est conservé aussi intact que possible ce qui permet de disposer d'une réserve d'air, nécessaire pour maintenir la transmission synaptique pendant la dissection. Un fil est noué autour de l'extrémité libre de la chaîne ce qui assure avec les cerques deux points de fixation agissant par adsorption à la surface de la lame et permet de tendre modérément la chaîne. Cette tension est absolument nécessaire et facilite la dissection dont quelques étapes sont représentées dans la fig. 14 .

La résection de la gaine du connectif entre les ganglions A_6 et A_5 présente certaines difficultés. Il s'agit de la déchirer en son milieu et sur toute sa circonférence sans comprimer les fibres sous-jacentes et de la replier en doigt de gant en rabattant les bords aussi près que possible des deux ganglions. Cette opération est effectuée à l'aide d'aiguilles à coudre très fines montées sur mandrin. La pointe doit être cependant relativement rigide de telle sorte qu'elle ne se courbe pas à la moindre pression au contact du verre. Il faut éviter de trop étirer les connectifs au cours de cette opération. L'utilisation d'une loupe binoculaire à fort grossissement (100 à 130), ainsi qu'un éclairage à fort contraste, sont souhaitables. Les limites latérales des fibres sont alors repérables. En général les fibres géantes I, II, et III du groupe ventral sont plus ou moins visibles. La fibre II est toujours aisée à identifier de par sa position médiane et du fait qu'elle est souvent juxtaposée à une fibre plus petite, ce qui donne à l'ensemble l'aspect d'une traînée plus claire tout le long des connectifs. Les aiguilles montées sont alors piquées dans le connectif, de part et d'autre de la fibre repérée, aussi près que possible, mais en évitant à tout prix de la toucher. Le but premier est de provoquer un isolement partiel, par tractions latérales simultanées, des deux faisceaux parallèles à la fibre, tout en progressant le long du connectif; c'est la partie la plus délicate. Par la suite il est aisé de décoller la fibre de proche en

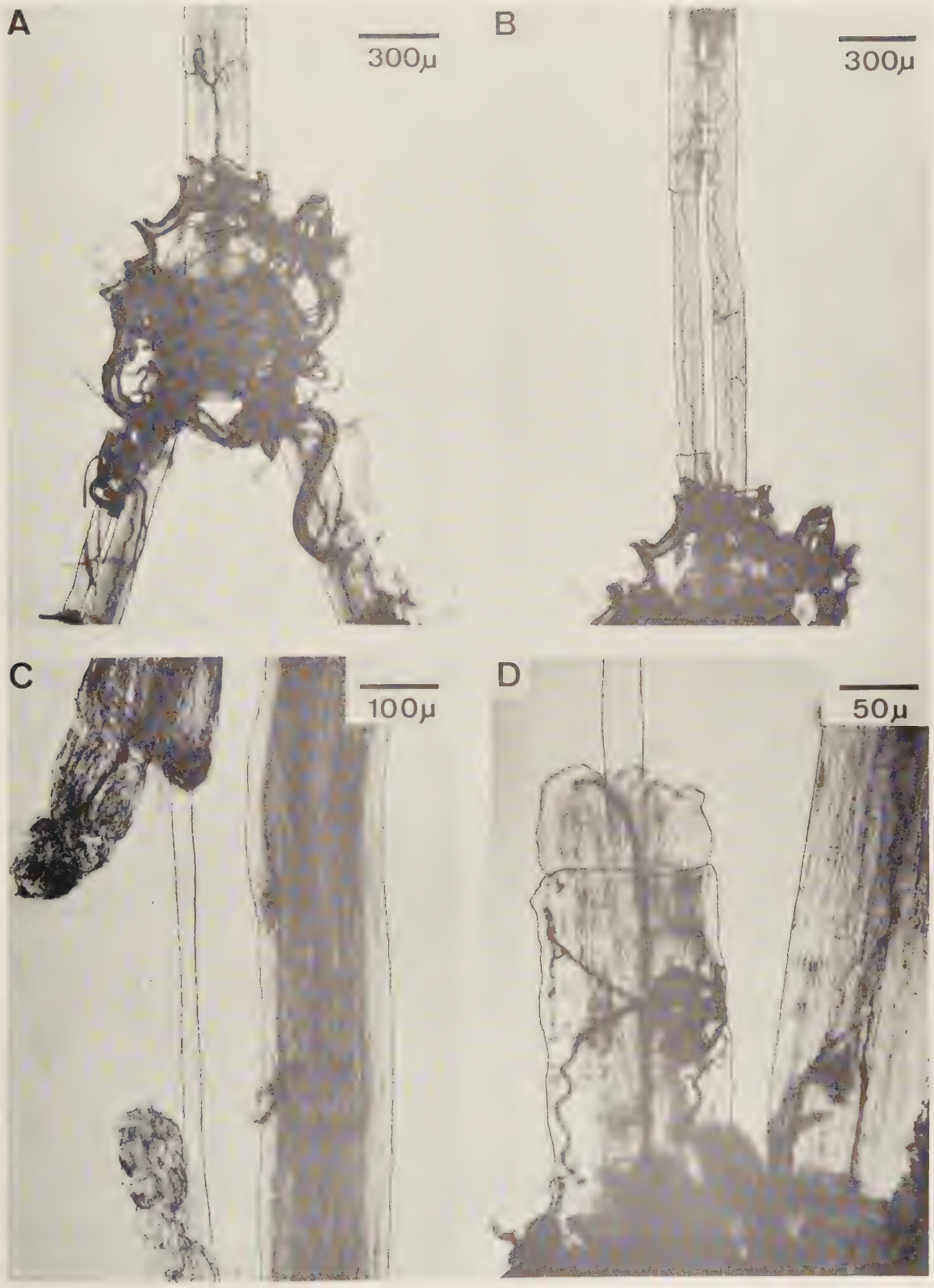
Fig. 14 - Photographies illustrant quelques étapes de la microdissection de la fibre géante médio-ventrale II chez *Periplaneta americana*.

A - Vue ventrale du ganglion A_6 sur laquelle on peut observer l'importance du réseau trachéen.

B - La gaine d'un des connectifs A_5-A_6 est délicatement déchirée en son milieu et retroussée en doigt de gant vers les deux extrêmités.

C - La fibre géante est isolée. Elle a été légèrement étirée au cours de la dissection. Seuls subsistent quelques tronçons de connectif qu'il suffira de sectionner ultérieurement.

D - La préparation est terminée. On peut observer le repli de la gaine du connectif. Le second connectif sera sectionné dans la cuve à expérimentation. Noter que la portion de fibre isolée débute à 150 µm environ du ganglion, afin de pouvoir placer une cloison limitant les compartiments huile et Ringer.


A
300µ
B
300µ
C
100µ
D
50µ

proche sur 1 à 2 mm de long, aussi près que possible du ganglion A_6 et de sectionner les faisceaux. Le connectif contralatéral doit être laissé intact. Il servira de support à la fibre, au cours du transport dans la cuve à expérimentation. Au cours de cette dissection,il faut surveiller en permanence le niveau du liquide physiologique, le moindre dessèchement pouvant être fatal. Il est souvent nécessaire de réaffûter les aiguilles. A la fin de la dissection, l'aspect de la fibre permet de juger de son état physiologique: elle doit paraître légèrement turgescente et son diamètre doit être relativement constant. Une fibre étirée et plus ou moins maltraitée présente un cytoplasme granuleux. Dans ce cas il est nécessaire de la rejeter. Le moindre contact de la fibre avec les aiguilles métalliques détermine une lésion, souvent irréversible. L'utilisation d'un liquide physiologique (Ringer) enrichi en calcium (10 mM au lieu de 1,8 mM) facilite la dissection: la fibre paraît plus " résistante " aux agressions mécaniques. Avec beaucoup d'habitude , le pourcentage de réussite peut atteindre 80 à 90 %.

B - MISE EN PLACE .

La cuve à expérimentation est représentée schématiquement par la fig. 15. Elle comprend essentiellement deux parties séparées par une cloison amovible en plexiglas. Le premier compartiment contient les cerques, les nerfs cercaux et le ganglion A_6. Les cerques sont posés sur une petite plateforme en paraffine, contiguë à un puits peu profond,où les nerfs cercaux et le ganglion sont continuellement irrigués par le liquide physiologique. Ce dernier parvient au ganglion par une fine rainure en communication avec un robinet à deux ou trois voies autorisant éventuellement le changement rapide de la solution physiologique en cours d'expérience. Cette rainure est en contact avec la première électrode. Le second compartiment est rempli d'huile de paraffine. Le reste de la préparation (A_5-T_3) est posé sur une seconde plateforme dans quelques gouttes de liquide physiologique en contact avec la deuxième électrode. La portion d'axone isolé flotte mollement dans l'huile, suspendue entre la cloison médiane et la seconde plateforme.

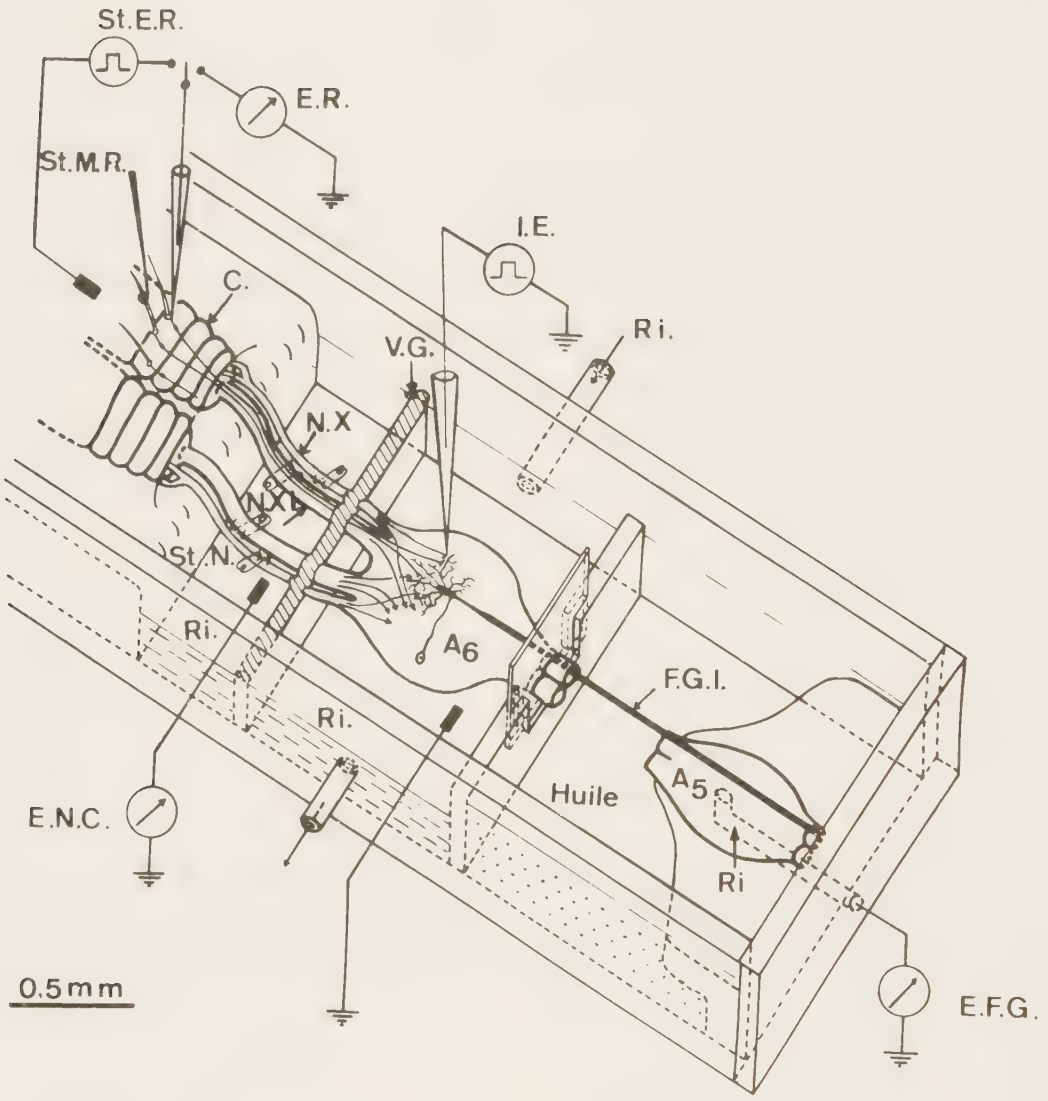


Fig. 15 - Représentation semischématique du dispositif expérimental.
A_5 - A_6, 5ème et 6ème ganglions abdominaux; C., cerque ; N.X. et N.XI, nerfs cercaux X et XI; F.G.I., fibre géante isolée; E.F.G., enregistrement au niveau de la fibre géante; E.N.C., enregistrement sur les nerfs cercaux; E.R., enregistrement par microélectrode à la base d'un mécanorécepteur cercal; I.E., injection microélectrophorétique; St.E.R., stimulation électrique d'un mécanorécepteur; St.M.R., stimulation mécanique d'un récepteur; St. N., stimulation électrique de l'un ou l'autre des nerfs cercaux X et XI; Ri., liquide physiologique (Ringer); V.G., pont de vaseline. L'échelle n'est donnée qu'à titre indicatif pour la région du ganglion A_6. Zone hachurée = Ringer; zone pointillée= compartiment rempli d'huile .

L'opération de mise en place apparaît plus délicate que la micro-dissection elle-même, aussi est-il nécessaire de prendre un certain nombre de précautions:

- nous avons déjà dit que le transport de la lame de verre à la cuve se faisait en conservant intact le connectif contralatéral entre les ganglions A_6 et A_5. Il a un double rôle: un rôle de soutien pour éviter tout étirement de la fibre et un rôle protecteur contre le dessèchement, en maintenant un " manchon " de Ringer aussi dense que possible autour d'elle;

- il ne faut pas remplir complètement, dans l'immédiat, le compartiment huile. L'huile risque en effet de déborder dans la rainure d'irrigation et de former soit des bouchons empêchant l'écoulement normal à vitesse régulière (ce qui peut surélever le niveau liquide et provoquer une traction mortelle sur la fibre isolée), soit un " film asphyxiant " par adsorption à la surface du ganglion;

- la dépose de la préparation dans la cuve est extrêmement délicate, le moindre contact de la fibre avec les parois déterminant des lésions toujours irréparables;

- la cloison intermédiaire mesure environ 100 µm d'épaisseur et vient pincer très légèrement le connectif juste à la sortie du ganglion A_6. Il est ainsi nécessaire de maintenir au moins cette distance entre le ganglion et la fibre isolée. La mise en place de la cloison développe des forces s'ajoutant aux tensions superficielles au contact " huile-Ringer ". Ces forces sont difficiles à contrôler et peuvent entraîner dans les cas extrêmes une sorte de "succion" de la préparation lorsque la cloison n'est pas mise en place d'un mouvement parfaitement régulier. L'étanchéité complète entre les compartiments Ringer et huile est assurée par un peu de vaseline;

- le connectif contralatéral est ensuite sectionné en place à l'aide de ciseaux très fins, tout près du ganglion A_5. Cette opération est également très délicate car, dans l'huile, la portion de fibre isolée se colle parfaitement au connectif contralatéral. Après section, le décollement doit se faire de proche en proche, très doucement, jusqu'au ganglion A_6. Toutes ces opérations sont évidemment effectuées sous loupe binoculaire à fort grossissement. La mise en place étant terminée, il faut assurer le plus rapidement possible l'irrigation du ganglion par le liquide physiologique approprié.

L'ensemble de ces diverses opérations, depuis le prélèvement de l'Insecte entier jusqu'à l'irrigation de la préparation isolée, dure entre 35 et 60 mn (moyenne 45 mn). Ce temps extrêmement court ne peut être atteint qu'avec une très grande habitude et un parfait rodage de toutes les opérations successives. Toutes les expériences utilisées dans ce mémoire ont été faites dans ces conditions afin de réduire au maximum l'interruption de la transmission, principalement par défaut d'oxygénation.

C - AVANTAGES DE CETTE TECHNIQUE .

La plupart des avantages sont immédiatement évidents:

- l'identification précise de l'axone géant isolé est possible tout au moins pour les fibres I, II, III, ce qui permet une étude systématique des afférences et des relations " entrée- sortie " ;
- dans de bonnes conditions de survie, la préparation peut se maintenir en bon état pendant au moins 8 à 10 heures (en fait nous n'avons jamais essayé de poursuivre certaines expériences au-delà d'une dizaine d'heures, bien que la préparation présentât encore tous les signes d'un bon état physiologique);
- l'absence de microélectrode supprime la crainte des vibrations et des lésions ce qui permet la stimulation mécanique des récepteurs, le changement des solutions physiologiques et même le transport de l'ensemble " cuve-préparation ";
- nous avons la possibilité d'introduire une microélectrode dans le ganglion, soit pour injecter des substances par microélectrophorèse, au voisinage des sites synaptiques, soit pour interroger d'autres cellules qui pourraient être en relation avec la fibre isolée;
- l'enregistrement de tous les potentiels postsynaptiques se fait sans incision de la gaine ganglionnaire;
- si cela est nécessaire, l'incision de la gaine, la section des nerfs ou même leur déplacement (pour les poser sur des électrodes par exemple) sont possibles en cours d'enregistrement ;

Bien que cette technique implique la réduction en amplitude des potentiels postsynaptiques (site d'enregistrement situé approximativement à la moitié de la constante d'espace), elle révèlera d'autres avantages (voir résultats),à savoir :

- la possibilité d'enregistrer des potentiels d'action aussi amples que ceux obtenus par microélectrode intracellulaire;
- la réduction du " bruit de fond " de dix fois environ (30 μV au lieu de 300 μV) ce qui permet d'accroître de plus de trois fois le rapport " signal-bruit " , notamment pour les potentiels postsynaptiques. Cela est en partie lié à une impédance d'entrée qui n'excède pas 2 à 4 MΩ (alors qu'une microélectrode fine présente une résistance de 20 à 35 MΩ);
- la stabilité du potentiel de membrane. Il peut rester pratiquement constant (variations n'excédant pas un à deux mV), pendant plusieurs heures.

Une technique similaire peut être appliquée à l'étude d'autres structures postsynaptiques, chez les Insectes ou chez d'autres animaux.

Chapitre III

Matériel et techniques.

A - MATERIEL BIOLOGIQUE .

Les chapitres précédents nous ont permis, semble-t-il, de justifier amplement le choix de *Periplaneta americana* pour notre étude . Cet Insecte présente par ailleurs l'avantage de pouvoir s'élever très facilement et de constituer de plus en plus un animal de laboratoire, au même titre que certains Vertébrés, Mollusques ou Crustacés.

Les Insectes sont élevés à température constante (25° $\pm$ 1° C) et nourris de lait en poudre, de farine, de carottes et quelquefois de laitues. L'eau leur est fournie dans des petits flacons de verre fermés par un tampon de coton hydrophile assurant par capillarité l'accessibilité à l'eau.

Nous avons exclusivement utilisé des individus adultes mâles, la plupart ayant atteint approximativement les 2/3 de leur vie adulte. Nous avons en effet observé que les fibres géantes sont, chez ces animaux, moins fragiles à la microdissection. Les membranes ont un aspect plus contrasté dans les mêmes conditions d'observation. En outre, à cet âge, les individus présentent un tissu adipeux moins abondant .

B- CONDITIONS EXPERIMENTALES .

1 - Facteurs physiques

De nombreux facteurs (température, pH, pression osmotique...) jouent un rôle non négligeable pouvant avoir quelque incidence sur la transmission synaptique.

Des travaux préliminaires (BERNARD, GAHERY et BOISTEL, 1965) ont montré les effets importants du facteur température sur différentes parties du système nerveux de la Blatte *Blabera craniifer* , effets qui varient aussi selon la vitesse de changement de la température. D'une manière générale, l'excitabilité diminue lorsque la température baisse, et inversement lorsqu'elle augmente. Bien que l'on ne connaisse pas parfaitement les effets sur la transmission synaptique, on peut néanmoins dire qu'elle a une action certaine sur les réactions chimiques et sur toute chaîne métabolique. Ces effets seront par conséquent plus importants sur une transmission nerveuse de type chimique. Dans ces conditions, nous devons éviter des variations en cours d'expérience. La plupart des expériences ainsi que les microdissections ont été effectuées entre 23 et 28 ° C avec une tolérance de 1° à 2° au cours de chacune d'elles. Nous avons dit par ailleurs que les animaux sont élevés à 25° C.

Le pH normal de la solution physiologique est voisin de 7. Nous avons noté que des variations pouvant atteindre une demi-unité pH n'entraînaient aucune perturbation appréciable de la transmission (seuil, potentiel de membrane par exemple). Néanmoins, le pH était mesuré, en particulier après addition de substances pharmacologiques, et éventuellement réajusté.

La pression osmotique idéale n'est pas parfaitement connue. Nous avons repris les formules de liquides physiologiques établies par d'autres auteurs . Cependant, des effets plus ou moins importants ont été observés au moment de la dissection de la fibre. Un milieu légèrement hypotonique semble favorable à la dissection. La fibre, rendue ainsi légèrement turgescente,devient plus visible et plus ferme. L'addition de glucose au moment de la mise en place permet de rétablir l'équilibre osmotique.

2 - Liquides physiologiques

Le liquide physiologique de base utilisé dans toutes nos expériences est légèrement modifié par rapport à celui de YAMASAKI et NARAHASHI (1959a) :

Na Cl	=	214 mM / L
K Cl	=	3,1 mM / L
$Ca\ Cl_2$	=	1,8 mM / L
$Na\ H_2\ PO_4$	=	0,2 mM / L
$Na_2H\ PO_4$	=	1,8 mM / L
Glucose	=	2 g / L

Les modifications ioniques apportées dans certaines expériences ont été compensées par le Na Cl pour conserver le même équilibre osmotique. Il nous est apparu rapidement que la concentration en ions calcium était d'une importance très grande. Le calcium joue en effet un double rôle : d'une part, sa présence dans le milieu extérieur est indispensable à la libération du médiateur (KATZ et MILEDI, 1965 et 1967 a), et d'autre part, il "stabilise" la membrane et intervient dans les phénomènes d'excitabilité (NARAHASHI (1963) , dans le cas de *Periplaneta americana*). La microdissection de la fibre est plus aisée lorsqu'on augmente la concentration en ions Ca^{++}. Elle paraît beaucoup plus "résistante" aux excitations mécaniques (étirements longitudinaux ou transversaux, attouchements par les aiguilles métalliques) et la transmission est facilitée (augmentation des potentiels postsynaptiques; voir plus loin). Compte-tenu de ces observations, la plupart des microdissections ont été effectuées avec une concentration en calcium égale à 5,4 mM. Nous avons parfois même "récupéré" certaines fibres en les plongeant momentanément dans un milieu hypercalcique (20 mM). Dans la plupart des cas, tout au moins tant que la fibre n'a pas subi de traumatismes trop graves, cette restauration se prolonge après retour au liquide physiologique normal.

D'une manière générale, nous pensons que le liquide physiologique habituellement utilisé est hypocalcique. La plupart de nos expériences ont été faites avec 5,4 mM d'ions Ca^{++}. Il est peut-être même souhaitable d'augmenter encore cette concentration jusqu'à 10 mM. Récemment, KERKUT, PITMAN et WALKER (1969 b) ont utilisé un milieu contenant 9 mM d'ions Ca^{++}, mais ces auteurs n'ont pas donné les raisons de ce choix. Dans ce cas, le tampon phosphate précipite les ions Ca^{++} ; il peut être remplacé par un tampon bicarbonate.

3 - Action des gaz

La préparation, mise en place dans la cuve à expériences, ne présente pas en général, une bonne transmission synaptique. La plupart du temps, elle est même complètement bloquée. La récupération ne se manifeste qu'après mise en circulation du liquide physiologique ou par oxygénation du liquide non circulant. L'oxygène est alors insufflé , en bulles aussi fines que possible, dans un petit puits distant de deux centimètres du ganglion. Cela démontre que la formule ionique du liquide physiologique comprenant chaque ion à la concentration convenable n'est pas suffisante pour assurer la transmission synaptique. Le liquide circulant apporte par conséquent un élément nouveau indispensable. Il semble que ce soit l'apport de gaz tel que l'oxygène. Le gaz carbonique a vraisemblablement aussi un rôle important (voir p.204).
Il n'est pas impossible également que le liquide circulant élimine des produits de déchets dont les effets plus ou moins toxiques deviendraient sensibles par leur accumulation.

C - TECHNIQUES D'ENREGISTREMENT .

1 - Enregistrement au niveau d'un récepteur cercal

Ce type d'enregistrement est effectué par une micropipette de verre, piquée à la base du mécanorécepteur et remplie de K Cl à la concentration de 200 mM / L [1], ou d'une solution physiologique. Ce mode d'enregistrement, qui a l'avantage d'être unitaire, présente l'inconvénient de provoquer des lésions. Nous lui avons préféré, la plupart du temps, l'enregistrement sur le nerf sensitif. Par contre, cette microélectrode peut être utilisée comme électrode de stimulation (voir plus loin).

2 - Enregistrement au niveau des nerfs sensitifs

Le message sensoriel, en provenance d'un seul mécanorécepteur, peut être également dérivé au niveau d'un des nerfs sensitifs cercaux X et XI, grâce à deux électrodes constituées par deux bains de Ringer séparés par un pont de vaseline dans lequel passe le nerf. Cette barrière de vaseline doit être aussi légère que possible afin de ne pas comprimer les fibres et risquer ainsi de bloquer en partie l'activité afférente.

Les potentiels dérivés sont parfois de faible amplitude ou même impossibles à distinguer du "bruit de fond". De plus, beaucoup de préparations présentent une activité de base qui masque les potentiels unitaires recherchés et liés au mécanorécepteur stimulé. Cette activité "spontanée" est due à une stimulation mécanique des récepteurs par le liquide physiologique ou par des poussières qui impriment un déplacement aux soies externes dans leur plan préférentiel de fonctionnement.

En assèchant le cerque et en le nettoyant soigneusement, il est possible de supprimer, au moins pendant un certain temps, toute activité parasite. Mais il arrive aussi qu'elle reprenne et gène ainsi l'observation. Ce mode d'enregistrement a néanmoins le grand mérite d'éviter toute lésion au récepteur (cas des stimulations mécaniques seulement).

L'enregistrement au niveau récepteur constitue un bon moyen de contrôler l'activité afférente– autrement dit présynaptique – dans la mesure où les contacts au niveau des fibres géantes sont monosynaptiques (nous en discuterons plus loin).

(1) Cette technique est celle utilisée par GUILLET, avec qui nous avons effectué certaines des expériences comportant des enregistrements simultanés aux niveaux récepteur et postsynaptique (CALLEC, GUILLET, PICHON et BOISTEL , 1969 et 1971).

Le contrôle au niveau des nerfs sensitifs s'est révélé dans ce cas beaucoup plus sûr, car au niveau récepteur, certains potentiels ne sont pas toujours conduits vers les centres. Cette observation a pu être faite par enregistrements simultanés "récepteur - nerf cercal". La raison de cette "barrière" n'est encore l'objet que de suppositions (CALLEC, GUILLET, PICHON et BOISTEL, 1969), mais mériterait d'être étudiée de manière plus approfondie.

3 - Enregistrement au niveau postsynaptique

Les potentiels postsynaptiques, qu'ils soient localisés au niveau des sites synaptiques ou propagés le long de la fibre géante, sont enregistrés par la méthode de "l'oil-gap", déjà décrite plus haut. Le schéma électrique équivalent est représenté par la figure 16.

L'électrode ganglionnaire est reliée à la masse et sert d'électrode de référence. L'électrode distale correspond au reste de la chaîne nerveuse; elle est virtuellement en contact électrique avec l'intérieur de la fibre, y compris les ramifications dendritiques.

Les potentiels d'action engendrés à l'intérieur du ganglion, au site d'initiation des influx, sont propagés le long de l'axone géant et, dans nos conditions expérimentales, sont bloqués à l'endroit où la fibre est isolée du reste du connectif et plongée dans l'huile. Cette zone peut être considérée comme le point d'enregistrement (R.P.) de toutes les variations de potentiel affectant la fibre géante isolée. A l'inverse des potentiels d'action, les potentiels postsynaptiques (PPSEs et PPSIs) restent localisés à la zone synaptique qui leur donne naissance et subissent de ce fait un décrément électrotonique entre cette zone et R.P. Autrement dit, ils diminuent exponentiellement au fur et à mesure qu'on s'éloigne de l'endroit où ils naissent.

Le décrément ainsi observé est lié au fait que la membrane n'est pas un parfait isolant entre l'axoplasme et le milieu extérieur. Des fuites de courant s'écoulent par conséquent dans le système "résistance-capacité" de la membrane axonique (Rm-Cm). Par voie de conséquence, une résistance de membrane élevée et une résistance longitudinale faible augmentent la distance parcourue par le signal. Dans le cas qui nous préoccupe, toutes les parties de l'axone géant situées dans le ganglion sont baignées dans un volume relativement important de liquide conducteur dont la résistance Re peut être considérée comme négligeable et le potentiel externe comme constant.

Dans ces conditions, nous pouvons, en première approximation, appliquer à l'axone géant les lois régissant les propriétés électriques du câble.

Si Vo est l'amplitude du signal initial, l'amplitude V du signal recueilli à la distance x est donnée par :

$$V = Vo \exp.\left(-x / \sqrt{Rm/Rax} \right)$$ (KATZ, 1966),

Rm et Rax étant respectivement les résistances transversale (membranaire) et longitudinale (axoplasmique). Le signe négatif signifie que le gradient de potentiel diminue progressivement. L'expression $\sqrt{Rm/Rax}$ représente la constante d'espace = λ ("lenght constant"). Cette expression est valable lorsque le ganglion est baigné par un volume relativement grand de liquide externe. Si la résistance externe Re n'est pas négligeable : $\lambda = \sqrt{\frac{Rm}{Rax + Re}}$.

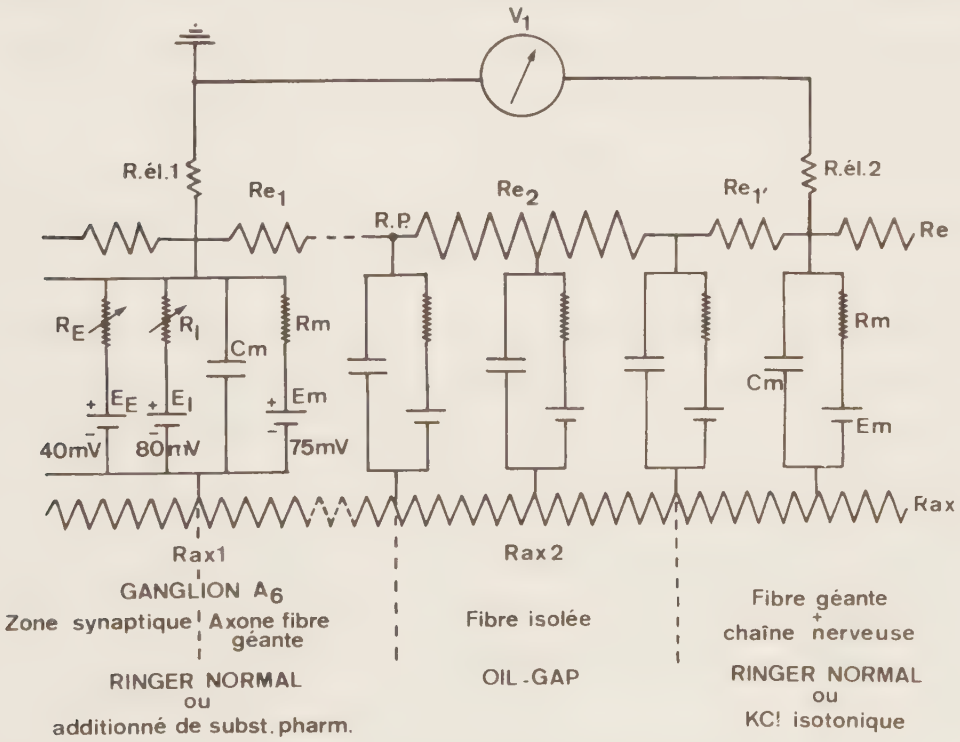


Fig. 16 - Schéma électrique équivalent du dispositif d'enregistrement illustré par la fig.15. Re: résistance externe totale comprenant respectivement la résistance externe de la portion intraganglionnaire (Re1), du manchon d'huile entourant la fibre isolée (Re2), et du reste de la chaîne nerveuse (Re1'). Rax : résistance axoplasmique (Rax1 et Rax2). R.él.1 et R.él.2 : résistances des électrodes 1 et 2. Em, Rm et Cm : respectivement potentiel, résistance et capacité membranaires de la fibre géante. E_E et R_E : potentiel et résistance des synapses excitatrices (la valeur indiquée, 40 mV, a été obtenue par extrapolation : voir p.153). E_I et R_I : potentiel et résistance des synapses inhibitrices. V1 : variations de potentiel enregistrées de part et d'autre de "l'oil-gap". R.P. : zone limitant le ganglion A_6 de la portion de fibre isolée. C'est à ce niveau que peut être reporté le site d'enregistrement.

Dans le cas de *Periplaneta americana* , la constante d'espace des fibres géantes est de l'ordre du millimètre (860 µm par YAMASAKI et NARAHASHI , 1959 b ; 1300 µm par BOISTEL , 1959). Ce facteur limitant joue un rôle extrêmement important dans notre cas particulier, compte-tenu de la position des sites synaptiques générateurs des courants. Ils sont en effet situés dans le neuropile, approximativement au tiers postérieur du ganglion, dont la longueur totale est voisine de 700 µm . Il est par conséquent absolument nécessaire de disséquer la fibre géante aussi près que possible du ganglion afin de rester dans les limites de la constante d'espace et d'éviter autant que possible les déperditions d'amplitude des potentiels post-synaptiques.

La différence de potentiel V est encore affectée d'un deuxième facteur limitant. Il s'agit d'un facteur de court-circuit qui dépend du rapport entre la résistance externe (Re2 le long de l'axone isolé) et la résistance axoplasmique (Rax2). La différence de potentiel réellement enregistrée devient alors :

$$V1 = V \times \frac{Re2}{Rax2 + Re2}$$

Plus Re2 sera grand par rapport à Rax2, et plus ce facteur de court-circuit se rapprochera de 1 et donc V1 de V.

Re2 est beaucoup augmentée par l'huile de paraffine, mais, en début d'expérience, il existe un mince manchon de Ringer autour de la fibre. Il se résorbe petit à petit, ce qui se traduit par une augmentation progressive de l'amplitude des potentiels d'action et des potentiels postsynaptiques. En fait, en cours d'expérience, les variations de ce facteur n'ont qu'une faible incidence, sinon d'augmenter d'une dizaine de mV le potentiel d'action propagé, au cours de la première heure d'expérience. L'amplitude moyenne des potentiels d'action ainsi recueillis est parfois même supérieure à celle obtenue par micro-électrode.

Cette technique nous permet également d'évaluer le potentiel de membrane après dépolarisation de l'électrode distale, à l'aide de K Cl isotonique. Il correspond à la différence de potentiel qui s'établit alors entre les deux électrodes, de part et d'autre de "l'oil-gap".

En résumé, cette technique nous permet de contrôler le niveau de polarisation membranaire, d'enregistrer le potentiel d'action propagé dans de très bonnes conditions, et dans des conditions relativement bonnes les potentiels postsynaptiques. Elle permet en outre de mesurer éventuellement le potentiel de membrane, et, comme nous le verrons plus loin, d'évaluer les variations de résistance de l'élément postsynaptique, tout au moins au cours de phénomènes assez lents. Enfin, il est également possible d'enregistrer, au niveau postsynaptique, la transmission électrotonique du potentiel cercal présynaptique, tout au moins quand ce dernier atteint une amplitude correspondant à la réponse de plusieurs fibres cercales.

D - TECHNIQUES DE STIMULATION

1 - Stimulation des mécanorécepteurs

Les récepteurs peuvent être stimulés mécaniquement ou électriquement.

La stimulation mécanique d'un seul mécanorécepteur identifiable est assurée par une micropipette plaquée contre la soie externe, et à laquelle on imprime, à l'aide d'un micromanipulateur, des déplacements plus ou moins amples, dans le plan préférentiel de fonctionnement.Une activation directe du récepteur peut être également provoquée, par de légers tapotements appliqués, par l'intermédiaire du micromanipulateur, à une microélectrode piquée à la base du récepteur

La stimulation électrique d'un seul mécanorécepteur est effectuée par des chocs rectangulaires brefs (0,01 à 0,1 ms) appliqués entre cette microélectrode et une électrode plus grosse (remplie de liquide physiologique) placée en bout de cerque, en contact avec l'intérieur. L'enregistrement de l'activité ainsi déclenchée s'opère par électrodes externes placées sur le nerf cercal afférent (voir plus haut). Cette technique a l'avantage de sélectionner les récepteurs et de pouvoir contrôler et doser parfaitement le stimulus. Cela est surtout intéressant pour stimuler un seul récepteur à des fréquences variables et pour étudier la réponse postsynaptique correspondante.

2 - Stimulation des nerfs cercaux afférents

Les nerfs cercaux X et XI homo- ou contralatéraux peuvent être stimulés électriquement par l'intermédiaire d'électrodes en argent chloruré plongées dans le liquide physiologique, afin d'éviter tout dessèchement des nerfs. Malgré le facteur court-circuit introduit par le Ringer, le seuil de déclenchement d'une réponse cercale est relativement bas (1 à 3 V) pour des chocs rectangulaires brefs (0,01 à 0,1 ms). L'artéfact de stimulation reste généralement très réduit.

3 - Polarisation électrique de la fibre géante

Il est parfois utile de soumettre la fibre géante à des courants artificiels afin de tester les réactions de sa membrane. Dans ce cas, nous avons utilisé un montage en pont de Wheatstone (Fig. 17)voisin de celui employé par d'autres auteurs (ARAKI et OTANI , 1955; FRANK et FUORTES , 1956; YAMASAKI et NARAHASHI , 1959 b).

Lorsque le pont est parfaitement équilibré, $V_{AB} = 0$ et $\frac{R1}{R3} = \frac{R2}{R4}$. Différentes valeurs de V_{AB} peuvent être obtenues en opérant sur les deux résistances variables R1 et R2. L'application d'une tension Ve entre C et D développe un courant I dans la branche C A D du pont, courant qui traverse la préparation. Ce courant peut être évalué à partir de la chute de potentiel qu'il provoque aux bornes d'une résistance placée dans la branche AD ou AC. Nous pouvons notamment utiliser la résistance R5.

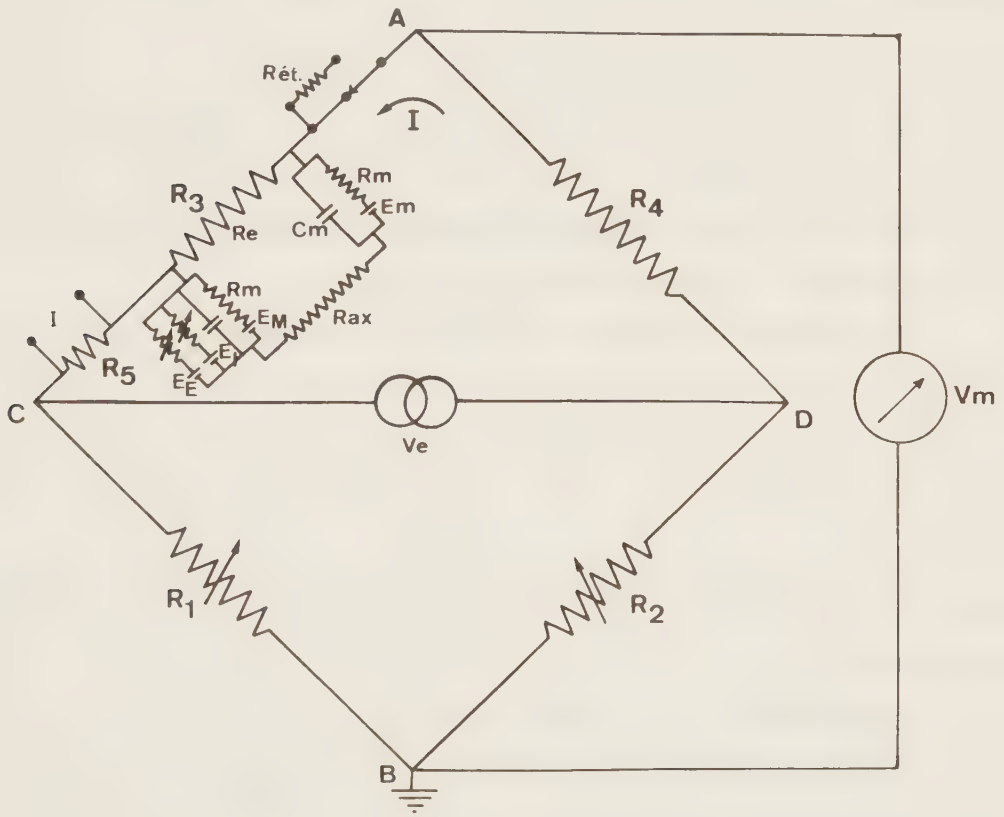


Fig. 17 - Diagramme du montage en pont de Wheatstone utilisé pour polariser et enregistrer simultanément au niveau de l'élément postsynaptique. R_5 = 330 KΩ (mesure de I) R3 = résistance de la préparation = 1 à 4 MΩ . R4 = 32 MΩ . R1 = 1 KΩ . R2 = 10 KΩ . R.ét. = résistance étalon = 680 KΩ . I = intensité du courant polarisant délivré par un générateur de tension rectangulaire placé dans la branche CD. Les symboles utilisés pour la préparation placée dans la branche AC sont les mêmes que ceux de la figure 16. Vm = variations de potentiel affectant la branche AB et comprenant notamment les potentiels postsynaptiques et propagés.

Nous avons utilisé ce montage de deux façons (fig. 18):

1° - Dans le but de compenser la chute de potentiel au travers des résistances autres que celle de la membrane.

Pratiquement, cette opération est très facile à réaliser. La constante de temps de la membrane (Rm x Cm) introduit une courbe exponentielle au début et à la fin du potentiel électrotonique, qui permet d'isoler aisément ce potentiel de ceux dus aux autres résistances. Ces dernières déterminent un front raide dû à l'absence de capacité. Il suffit de supprimer le front raide en ajustant le début de la courbe exponentielle avec la ligne de base (ce réglage se fait à l'aide des résistances variables R1et R2) pour obtenir une courbe dont un exemple est fourni dans la figure 18 A. Dans ces conditions, la différence de potentiel observée entre A et B (V_{AB}) est sensiblement égale à la variation de potentiel Vm que subit la membrane de la fibre géante. Il suffit pour cela de prendre R4 aussi élevée que possible. Dans la pratique, R4 est approximativement 10 fois plus élevée que R3 .

Cette méthode permet de déplacer artificiellement le potentiel de membrane; elle a un double but :

- établir la courbe "courant-voltage" (voir p.151) ; elle permet d'apprécier le comportement membranaire pour des potentiels électrotoniques hyper- ou dépolarisants.

- suivre l'évolution des potentiels postsynaptiques en fonction du potentiel de membrane (voir p. 153). Nous verrons alors quels enseignements nous pouvons en tirer.

Remarquons que le potentiel transmembranaire Vm est essentiellement fonction de la résistance de membrane Rm (voir figure 16). Autrement dit, une variation de Vm traduit une variation de Rm. Cela est vrai à condition que la résistance axoplasmique (Rax) ne subisse aucun changement c'est-à-dire lorsque les mesures se déroulent sur des périodes relativement brèves.

2° - Dans le but de compenser la chute de potentiel au travers de toutes les résistances, y compris celle de la membrane.

A l'équilibre, on obtient une courbe dont un exemple est fourni dans la figure 18 B. Dans ce cas, $V_{AB} = 0$.

D'après ce que nous venons de dire plus haut, il est aisé de comprendre que, si les résistances R1, R2 et R4 sont maintenues constantes,

l'observation d'un déséquilibre dans le pont de résistances ne pourra provenir, dans la plupart des cas, que d'une variation de Rm. Cette deuxième méthode est très pratique ; elle est fréquemment utilisée pour tester rapidement l'action de substances pharmacologiques sur la conductance membranaire. La résistance étalon (R.ét.) placée dans la branche AC du pont, permet de définir, par addition ou soustraction, le sens de la variation de Rm au moment du déséquilibre et d'en préciser la valeur.

Cependant, s'il est possible, dans le dispositif expérimental employé, d'objectiver et même d'évaluer des variations de Rm, il est évident que ces variations peuvent intéresser toute portion de membrane de la fibre géante incluse dans le ganglion. Il est cependant possible, en opérant par comparaison, de différencier à peu près dans tous les cas, les variations propres à l'élément conducteur (c'est-à-dire l'axone proprement dit) et à la zone synaptique (arbre dendritique et segment intégrateur).

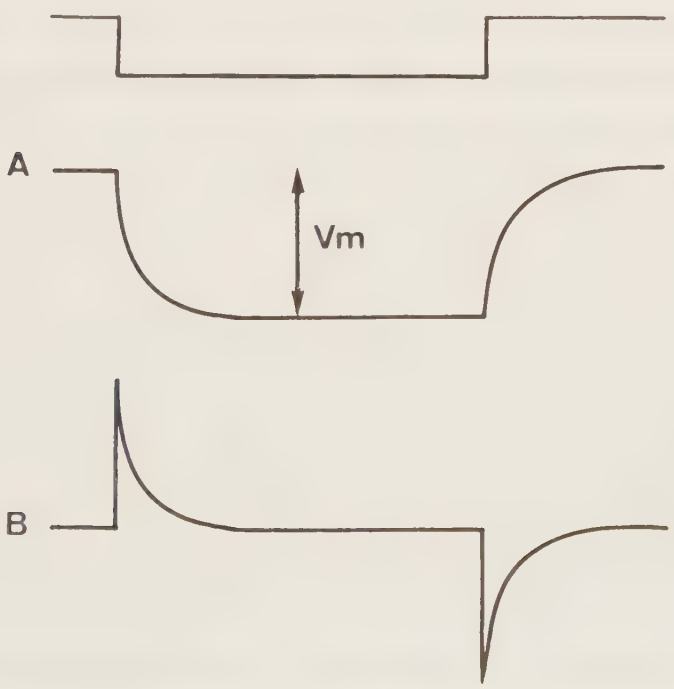


Fig. 18 - Cette figure illustre les deux types de réglages que nous avons utilisés en relation avec le montage en pont de Wheatstone (voir détails dans le texte).
Sous l'action d'un choc polarisant, le pont est équilibré pour compenser les chutes de potentiel aux bornes de toutes les résistances ohmiques, y compris (B) ou non (A) la chute de potentiel aux bornes de la résistance membranaire de l'élément postsynaptique. Dans ce dernier cas, la tension Vm mesurée donne une valeur approchée de la variation subie par le potentiel de membrane.

E - TECHNIQUES PHARMACOLOGIQUES

L'application de certaines substances, choisies selon les données développées dans la première partie, a été effectuée par deux techniques différentes : soit par dilution dans le liquide physiologique circulant, soit par injection microélectrophorétique.

1 - Les substances suivantes ont été diluées dans le Ringer :

- Chlorure d'acétylcholine (ACh)	Sigma
- Sulfate de nicotine	K & K
- Chlorure d'acétyl β méthylcholine	Sigma
- Chlorure de d-tubocurarine	Sigma
- Sulfate d'atropine	Fluka
- Sulfate d'ésérine	Sigma
- Acide γ aminobutyrique (GABA)	Sigma
- Glycine	Sigma
- Picrotoxine	Fluka

Cette première méthode présente évidemment de sérieux inconvénients. Elle ne permet pas , en particulier, d'éviter l'action de ces substances sur des éléments autres que la fibre interrogée. Il demeure donc toujours la possibilité d'une action indirecte. En outre, les substances sont souvent ralenties, voire bloquées, par diverses "barrières" (nous avons déjà vu que c'est le cas pour l'ACh, ce qui nécessite des concentrations élevées).

Afin de faciliter, soit la pénétration des solutions, soit celle de la microélectrode contenant certaines substances, nous avons dû travailler, dans la plupart des expériences pharmacologiques, sur ganglion "dégainé". Ce terme signifie en fait, que nous avons pratiqué une incision de la gaine, aussi petite que possible, dans la moitié dorsale de l'hémi-ganglion qui ne contient pas l'arbre dendritique de la fibre disséquée. Cette dissection ne perturbe en aucun cas la fibre géante et ses principales connexions synaptiques. Elle peut être pratiquée, en cours d'enregistrement, lorsque la préparation est en place (figure 19). On peut observer, sur cette figure, les répercussions de la dissection de la gaine sur l'enregistrement du potentiel membranaire. Pendant la durée de la dissection, nous observons quelques variations qui sont dues aux artéfacts créés par le mouvement des pinces à dissections dans le liquide environnant l'électrode, perturbations qui se produisent même sans toucher le ganglion.

Ce contrôle peut être complété par l'audition d'une activité de base, dérivée sur un haut-parleur, et constituée de PPSEs unitaires dus à l'activité de certains mécanorécepteurs (voir p. 123). Elle ne subit aucune variation notable au cours de la dissection.

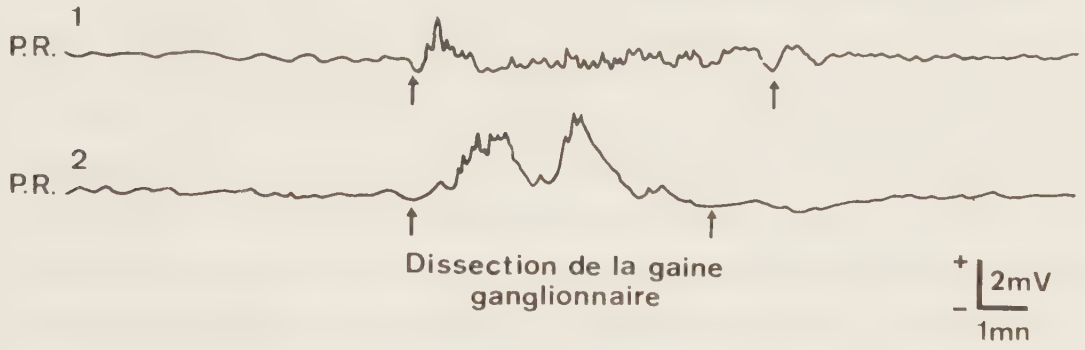


Fig. 19 - Enregistrement des variations du potentiel membranaire (P.R.) au cours de l'incision de la gaine du ganglion A_6 . Noter que pour les deux préparations ainsi représentées, le niveau de polarisation demeure inchangé après l'incision.

Le contrôle des effets de la substance étudiée sur l'élément postsynaptique est assuré par la mesure simultanée des variations du potentiel membranaire et de la résistance Rm. De plus, l'activité dérivée sur les nerfs afférents permet de déceler d'éventuelles actions au niveau des terminaisons présynaptiques par l'apparition de volées de potentiels d'action antidromiques.

2 - Injections microélectrophorétiques

Seuls l'ACh et le GABA ont été injectés de cette manière.

Des microélectrodes très fines (moins de 0,5 µm le plus souvent) sont d'abord remplies d'eau distillée suivant la technique classique, par ébullition sous vide. L'eau distillée est ensuite enlevée du corps de l'électrode et remplacée par la solution d'ACh ou de GABA (1 à 3 M/L dans de l'eau distillée). La diffusion des substances jusqu'à la pointe des microélectrodes est assurée par une à deux journées de repos au réfrigérateur (+ 4°C). Les électrodes ainsi obtenues peuvent être conservées plusieurs jours à cette température. Leur résistance varie généralement de 20 à 40 MΩ . Comme le point isoélectrique du GABA est 7,3 et que le pH du liquide physiologique est voisin de 7,0, il est nécessaire d'ajuster le pH de la solution de GABA du côté acide (par exemple 2,5) pour pouvoir l'injecter comme cation. L'ACh est également

injectée comme cation (électrode positive). La quantité d'ions déplacés est théoriquement proportionnelle à la quantité d'électricité Q coulombs (voir BRADLEY et CANDY , 1970) , elle-même proportionnelle à l'intensité et au temps de passage du courant.

Les microélectrodes sont introduites dans le ganglion après incision de la gaine, et progressent à l'aide d'un manipulateur micrométrique jusqu'à 100 µm environ de profondeur, dans le voisinage du champ dendritique de l'axone disséqué. La microélectrode progresse alors plus lentement; de 5 en 5 µm, on déclenche des chocs électriques brefs qui libèrent une certaine quantité d'ACh ou de GABA, et cela jusqu'à ce qu'une zone sensible soit rencontrée. La microélectrode est alors ajustée au micron près afin d'obtenir le maximum de réponse pour un courant donné. Le test utilisé est une variation, soit du potentiel de membrane, soit de la résistance membranaire Rm de l'élément postsynaptique. La microélectrode peut être maintenue dans cette position , parfois pendant plusieurs heures, sans modifications sensibles des réponses.

Nous avons parfois utilisé des microélectrodes doubles, l'un des canaux étant rempli d'ACh, l'autre de GABA.

Dans certains cas, lorsque la pointe de la microélectrode excède 1 µm, une tension permanente de sens contraire (0,5 V environ) permet, entre chaque injection, d'éviter une diffusion trop importante des solutés. Dans l'utilisation de cette technique relativement facile d'emploi, une inconnue demeure, c'est la position exacte de la pointe de la microélectrode par rapport à la zone active.

La technique d'injection microélectrophorétique présente cependant quelques inconvénients, surtout lorsqu'elle est pratiquée dans le neuropile (CURTIS et CRAWFORD , 1969) :

- la distribution de la substance injectée n'est pas uniforme;
- il est impossible de déterminer la concentration précise de la drogue au niveau des sites activés;
- la relation entre le courant et la quantité de substance injectée n'est pas nécessairement constante. En particulier, le courant peut varier pendant son passage au travers des tissus.

F - APPAREILLAGE UTILISE

Oscilloscope Tektronix , type 502 A monté en permanence avec une caméra Grass modèle C4, permettant la prise de vues en déroulement continu ou en vue par vue. Dans ce cas, un deuxième oscilloscope sert de contrôle.

Oscilloscope Tektronix type 549 à mémoire.

Enregistreur potentiométrique à encre Beckman . Cet appareil s'est révélé d'une grande utilité pour juger en permanence de l'état physiologique de la préparation, et cela par l'enregistrement continu des variations lentes du potentiel membranaire. Une préparation en bon état ne présente, pendant plusieurs heures, que des variations infimes de potentiel (souvent moins de 1 mV) à condition de s'assurer au départ de la présence éventuelle de potentiels de jonctions. Des électrodes en argent chloruré donnent, dans la plupart des cas, des potentiels de jonctions faibles (moins de 1 mV) et pratiquement constants.

Cathode follower et amplificateur à haute impédance d'entrée et capacité négative , Bioelectric Instruments , type NF1.

Stimulateurs Grass , type S4, et unités d'isolement.

Loupe binoculaire Leitz.

Troisième partie

Résultats expérimentaux.

Chapitre I

Analyse des potentiels postsynaptiques.

A - POTENTIELS POSTSYNAPTIQUES UNITAIRES.

La préparation complète (comprenant les deux cerques, les nerfs cercaux X et XI homo-et contralatéraux), mise en place dans la cuve à expérimentations, est le siège, dans la plupart des cas, d'une intense activité électrique postsynaptique (fig. 20 A). Cette sorte de " bruit synaptique " est

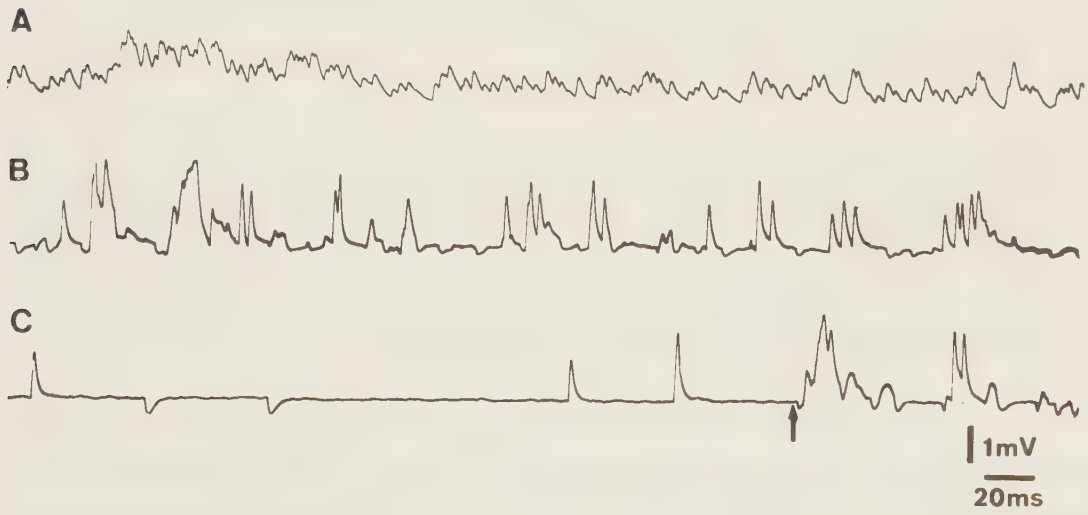


Fig. 20 - Activité postsynaptique " spontanée ", composée de PPSEs et de PPSIs unitaires, enregistrée au niveau du ganglion A_6 (fibre géante II). Un assèchement soigneux des cerques (de A à C) est accompagné d'une diminution progressive et même d'un arrêt complet de cette activité. $[Ca^{++}] = 5,4$ mM.

A - Grande densité de potentiels, telle qu'elle se présente au tout début de chaque expérience. Elle correspond à de nombreux mécanorécepteurs cercaux activés par une couche mince de liquide physiologique.

B - Activité succédant à un assèchement modéré des cerques. Les PPSIs deviennent parfaitement visibles. L'amplitude des potentiels augmente nettement. La" fatigue " synaptique s'estompe avec la diminution de fréquence des potentiels. Il y a parallèlement une résorption partielle du film de Ringer entourant la portion de fibre isolée.

C - Seuls quelques récepteurs sont encore spontanément actifs. Ils donnent lieu à quelques PPSEs isolés accompagnés de PPSIs. La flèche indique une faible activité composite induite par un léger souffle d'air appliqué sur les récepteurs cercaux.

constituée de nombreuses petites dépolarisations arythmiques variant en amplitude et, dans ces conditions, difficiles à étudier isolément. Cette activité peut être supprimée par la section des nerfs cercaux ou considérablement diminuée par un assèchement des cerques et un nettoyage soigné des récepteurs cercaux (fig. 20 B et C). Il est donc clair que cette activité est en étroite relation avec l'activité de ces mécanorécepteurs et qu'on ne peut pas lui accorder le terme de " spontanée ".

Si l'on amplifie au moins dix fois plus, on peut observer un deuxième niveau d'intense activité, distincte de la première, et bien moins ample (fig. 21). Cette activité de fond, qui excède rarement 200 µV, subsiste après section des nerfs cercaux et ressemble beaucoup à la première, au facteur amplitude près.

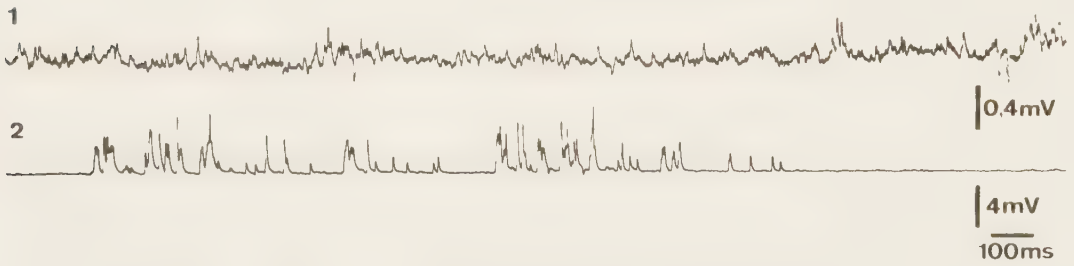


Fig. 21 - 1. " Bruit synaptique " de faible amplitude, présent en l'absence de toute stimulation, et qui pourrait comprendre des potentiels analogues à des potentiels miniatures.
2. Activité composée essentiellement de PPSEs unitaires dus à la mise en jeu mécanique de quelques récepteurs cercaux. Ces potentiels se greffent sur le fond représenté en 1.
Noter la différence d'amplification entre les 2 tracés.

Les éléments qui la constituent ne peuvent cependant pas être étudiés isolément, dans les conditions normales d'enregistrement. Il est possible qu'il s'agisse d'unités basales spontanées comparables aux potentiels miniatures décrits à la synapse neuromusculaire (FATT et KATZ, 1952) ou au niveau de certaines synapses centrales (KATZ et MILEDI, 1963). Nous ne pouvons pas en dire davantage pour le moment, mais une étude complète mériterait peut-être d'être entreprise.

Au cours de l'opération de nettoyage des cerques, ces dépolarisations brèves, tout en diminuant en fréquence, s'accroissent en amplitude. Elles démasquent souvent de petites hyperpolarisations, beaucoup moins fréquentes (fig. 20 B et C).

Ces divers potentiels deviennent ainsi parfaitement visibles, bien isolés, et il est alors possible d'analyser leurs principales caractéristiques. Ils présentent un temps de montée de 2 à 5 ms et décroissent ensuite de manière approximativement exponentielle avec une constante de temps de 4 à 10 ms.

Leur amplitude varie grosso-modo de 100 µV à un peu plus de 2 mV dans un milieu dont la concentration en calcium égale 1,8 mM. Ces caractéristiques ressemblent fort à celles des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSEs) et inhibiteurs (PPSIs), rencontrés chez d'autres animaux (motoneurones de Chat ou certaines cellules ganglionnaires d'Aplysie, par exemple).

Cependant , il n'est pas exclu qu'ils puissent correspondre à la conduction électrotonique de potentiels d'action qui auraient pris naissance dans les ramifications dendritiques les plus grosses et qui seraient bloqués bien avant le site d'enregistrement,ou encore à l'influence électrotonique de potentiels d'action parcourant les fibres voisines. En rapport avec la première supposition, nous pouvons relater l'enregistrement possible de potentiels nettement plus petits que les potentiels d'action propagés (quelques mV au lieu de 90 à 110 mV), qui succèdent parfois à une volée (voir par exemple la fig. 61). Mais si ces potentiels sont comparables en amplitude, ils ont une durée bien plus petite que celle des PPSEs. La deuxième hypothèse semble également peu vraisemblable car il est fréquent d'enregistrer des potentiels qui ont une forme nettement biphasique et qui sont tout simplement l'équivalent d'un enregistrement par électrodes externes (fig.22). Dès lors, nous appellerons PPSEs et PPSIs ces petites ondes dépolarisantes ou hyperpolarisantes; nous aurons d'ailleurs l'occasion d'apporter d'autres arguments tendant à confirmer cette dénomination.

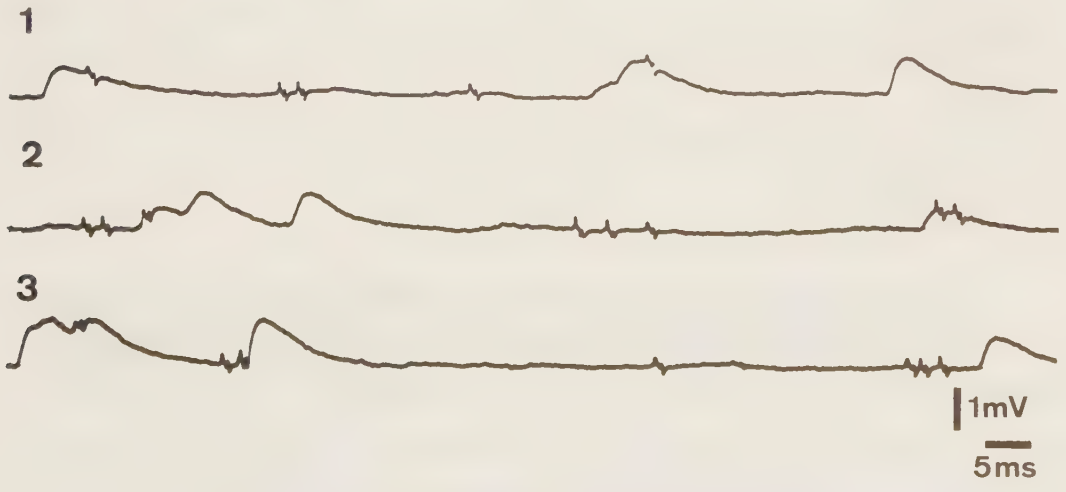


Fig. 22 - Comparaison entre des PPSEs unitaires et des potentiels biphasiques conduits électrotoniquement à partir d'une fibre voisine (voir texte).

1 - PPSEs unitaires liés à l'activité de nombreux mécanorécepteurs.

Dans le liquide physiologique " normal " ($[Ca^{++}]$ = 1,8 mM),l'amplitude des PPSEs varie entre 0,15 et 0,9 mV; seuls quelques-uns atteignent au maximum 2 mV. L'histogramme de la fig. 23 A montre qu'ils se répartissent autour d'une valeur moyenne de 0,5 mV. Le temps de montée peut varier de 1,7 à 3,3 ms, mais présente aune pointe caractéristique pour 2,0 ms (fig.23 B). Leur constante de temps est comprise entre 4 et 6 ms, et leur durée totale de 12 à 18 ms.

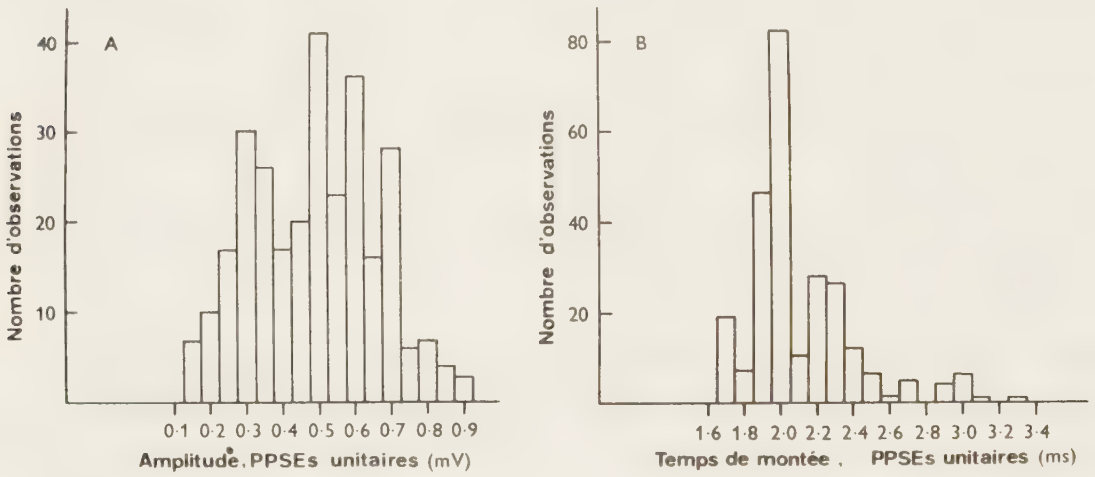


Fig. 23 - Histogrammes de répartition des amplitudes (A) et des temps de montée (B) de PPSEs unitaires provenant de l'activité de divers mécanorécepteurs. $[Ca^{++}]$ = 1,8 mM.

Les PPSEs ayant servi à constituer ces histogrammes sont isolés, et pris au hasard pendant des périodes d'activité faible. Cependant,des phénomènes de facilitation ou plus fréquemment de " fatigue " ne sont pas exclus, lorsque certains récepteurs sont en activité depuis un certain temps (voir p. 186). C'est le cas pour les PPSEs composant l'activité de base de la fig.20A qui sont nettement plus petits que les PPSEs isolés (fig. 20 C).

2 - PPSEs unitaires liés à l'activité d'un seul mécanorécepteur.

L'enregistrement simultané de l'activité pré- et postsynaptique , déclenchée par l'activation d'un seul récepteur cercal (la préparation étant initialement totalement silencieuse),montre qu'il existe une étroite correspondance entre chaque potentiel d'action enregistré au niveau même du récepteur (fig. 24) ou sur le nerf cercal XI (fig. 25) et chaque PPSE. Ce dernier représente une réponse postsynaptique sous-liminaire de la fibre géante et est relié à un seul potentiel d'action présynaptique ; il peut être qualifié de PPSE unitaire.

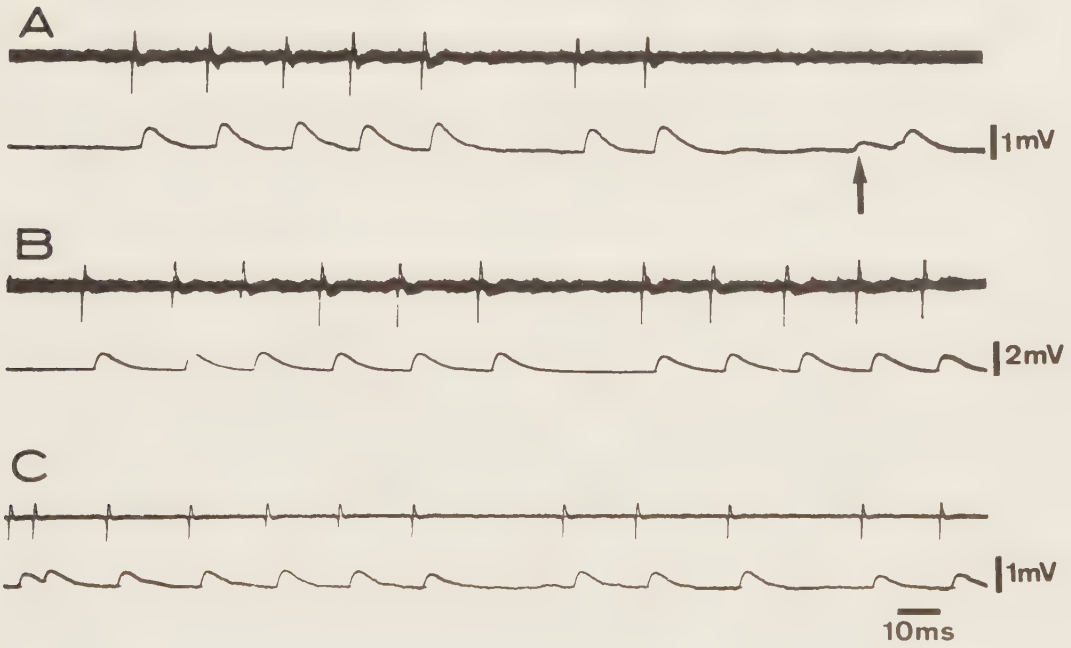


Fig. 24 - Enregistrements simultanés de potentiels d'action présynaptiques cercaux et des PPSEs unitaires correspondants. Les potentiels afférents (tracés du haut) sont dérivés par microélectrode à partir de mécanorécepteurs appartenant à trois préparations différentes (A, B, C). Les PPSEs (tracés du bas) appartiennent tous à la même fibre géante II. La flèche en A indique un PPSE composite dû à une autre afférence.

Si l'amplitude des PPSEs correspondant à différents récepteurs (fig. 25 A, B, C) subit des variations, il en est de même pour l'amplitude des PPSEs liés à un seul et même récepteur (fig. 26 A). Elle varie approximativement du simple au double, parfois même du simple au triple et n'est jamais nulle. Autrement dit, nous n'avons jamais observé d'échec à la transmission. Le temps de montée demeure relativement constant (environ 2 ms) (fig. 26 B), confirmant les données évaluées sur un plus grand nombre de récepteurs (fig. 23 B), tandis que la constante de temps peut varier de 3,9 à 5,3 ms.

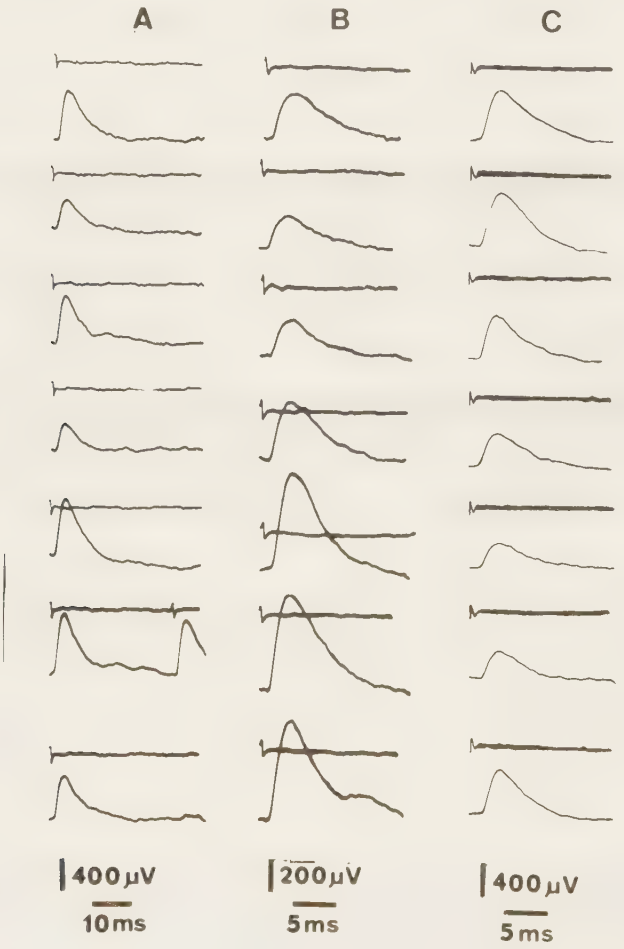


Fig. 25 - Variations en amplitude de PPSEs unitaires correspondant à un mécanorécepteur donné. Les trois exemples A, B et C rassemblent un échantillonnage de PPSEs pris sur trois préparations différentes. Les récepteurs sont stimulés mécaniquement et à faible fréquence pour éviter toute " fatigue ". Le potentiel d'action présynaptique dérivé par électrodes externes sur le nerf cercal XI (tracés du haut)est utilisé pour déclencher le balayage. L'échelle verticale ne s'adresse qu'aux PPSEs.

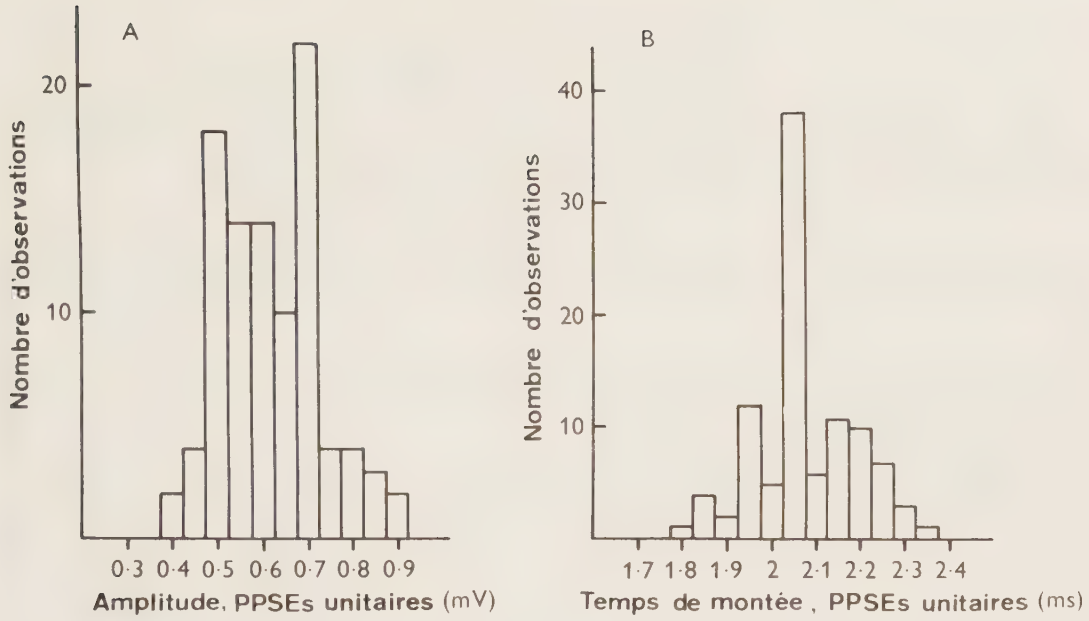


Fig. 26 - Histogrammes de répartition des amplitudes (A) et des temps de montée (B) de PPSEs unitaires correspondant à l'activité d'un seul mécanorécepteur cercal. $[Ca^{++}] = 1,8$ mM.

Le délai entre le potentiel d'action, dérivé aussi près que possible de son entrée dans le ganglion (afin de minimiser le délai de conduction),et le début de la phase ascendante d'un PPSE unitaire est en moyenne de 0,85 ms. Il présente un coefficient de variabilité de 8 à 9 %. En tenant compte de la vitesse de conduction dans le nerf cercal (1,5 à 2 m/s selon PUMPHREY et RAWDON-SMITH, 1937; ROEDER, KENNEDY et SAMSON, 1947; ROEDER, 1948 a) et de la longueur de l'élément présynaptique parcouru (environ 350 µm), la valeur précédente peut être corrigée et ramenée à 0,68 ms (0,85 ms moins 0,17 ms).

3 - PPSIs unitaires.

Certains PPSIs peuvent subsister lorsque le ganglion A_6 est complètement déconnecté (section des nerfs X et XI en particulier) tandis que d'autres peuvent être déclenchés par la stimulation ménagée de certaines régions cercales (nerfs X intacts).

Nous verrons successivement ces deux types de PPSIs.

a - PPSIs " spontanés ".

Après section des nerfs X et XI, les PPSEs unitaires disparaissent immédiatement tandis que subsistent, dans la plupart des cas, des PPSIs de faible amplitude tels que ceux observés dans les figures 27 et 20.

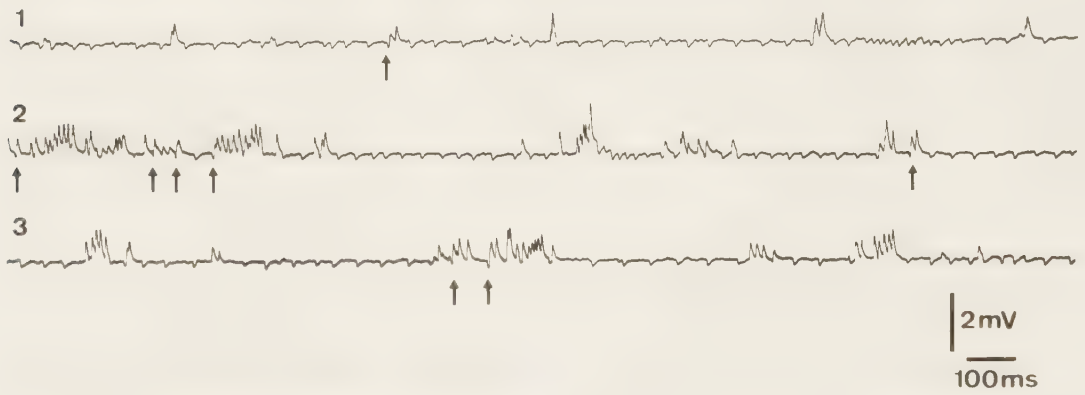


Fig. 27 - Exemples de PPSIs unitaires " spontanés " . Leur fréquence relativement constante semble indiquer leur lien avec l'activité d'un seul et même neurone présynaptique. Cette activité subsiste après désafférentation complète du ganglion. Les flèches marquent l'interaction entre un PPSE unitaire et la phase de montée d'un PPSI unitaire. Noter que les PPSEs ne semblent pas subir de variation d'amplitude au cours de cette phase. Les PPSEs sont déclenchés par de légers souffles d'air.

Ces PPSIs sont par conséquent vraisemblablement liés à l'activité d'interneurones intraganglionnaires ou de motoneurones dont une branche pourrait innerver la fibre géante. En fait ils ne persistent que rarement. Ils disparaissent petit à petit au cours de la première heure d'expérience mais dans certains cas, particulièrement favorables, nous avons pu les observer pendant plusieurs heures, bien souvent sous forme d'activité rythmique (4 à 30 par seconde). La fréquence se maintient parfois rigoureusement constante. Il est fortement probable que dans ce cas ils puissent être attribués à l'activité d'une seule fibre présynaptique. On peut par conséquent leur conférer la qualité de PPSIs unitaires. Ces neurones inhibiteurs intraganglionnaires pourraient être mis en activité au cours de la dissection ou de la mise en place .

D'une manière générale, au cours d'une même expérience, il est rare de déceler, en se basant sur l'aspect rythmique des PPSIs unitaires, plus de deux neurones inhibiteurs en activité (histogramme de la fig. 28). Ces faits laissent supposer que leur nombre serait limité.

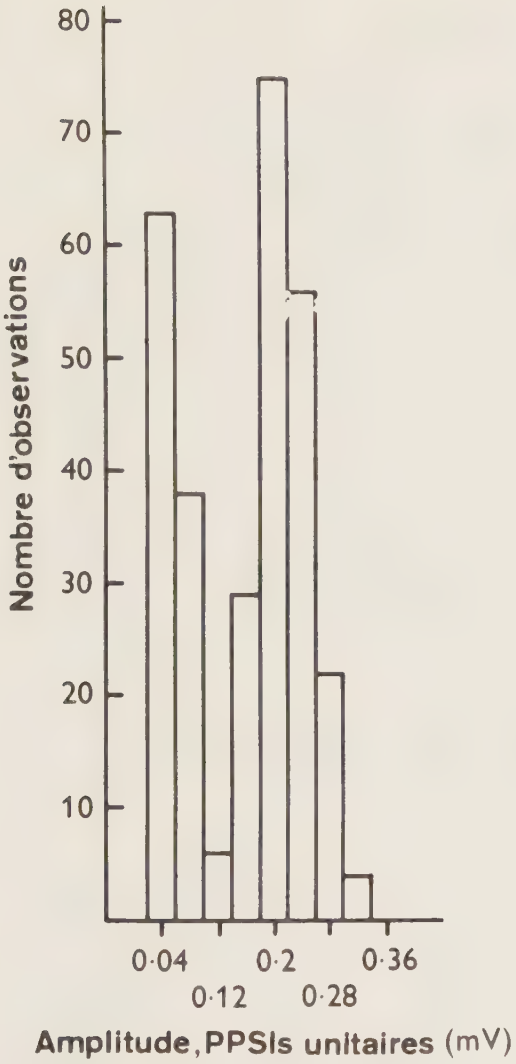


Fig. 28 - Histogramme de répartition des amplitudes de PPSIs unitaires. Ces exemples ont été prélevés dans une préparation particulièrement riche en PPSIs. Ils indiquent néanmoins le peu d'interneurones inhibiteurs vraisemblablement en activité (sans doute deux). $[Ca^{++}]$ = 1,8 mM.

En milieu physiologique peu calcifié (1,8 mM/L), leurs caractéristiques (tableau V) dénotent une amplitude toujours plus faible que celle des PPSEs unitaires, tandis que les valeurs comparatives du temps de montée, de la constante de temps et de la durée totale révèlent des potentiels sensiblement plus lents. Les PPSIs unitaires correspondant à une seule fibre présynaptique (cas particulièrement favorable où ils présentent une fréquence constante pendant assez longtemps) subissent également quelques variations dans leurs caractéristiques. Comme pour les PPSEs unitaires, l'amplitude peut varier du simple au double (histogramme de la fig. 29 A). La moyenne des temps de montée est égale à 4,6 ms (3,7 à 5,2 ms) (histogramme de la fig. 29 B) tandis que la constante de temps est égale à 7,4 ms (6,1 à 10,1 ms).

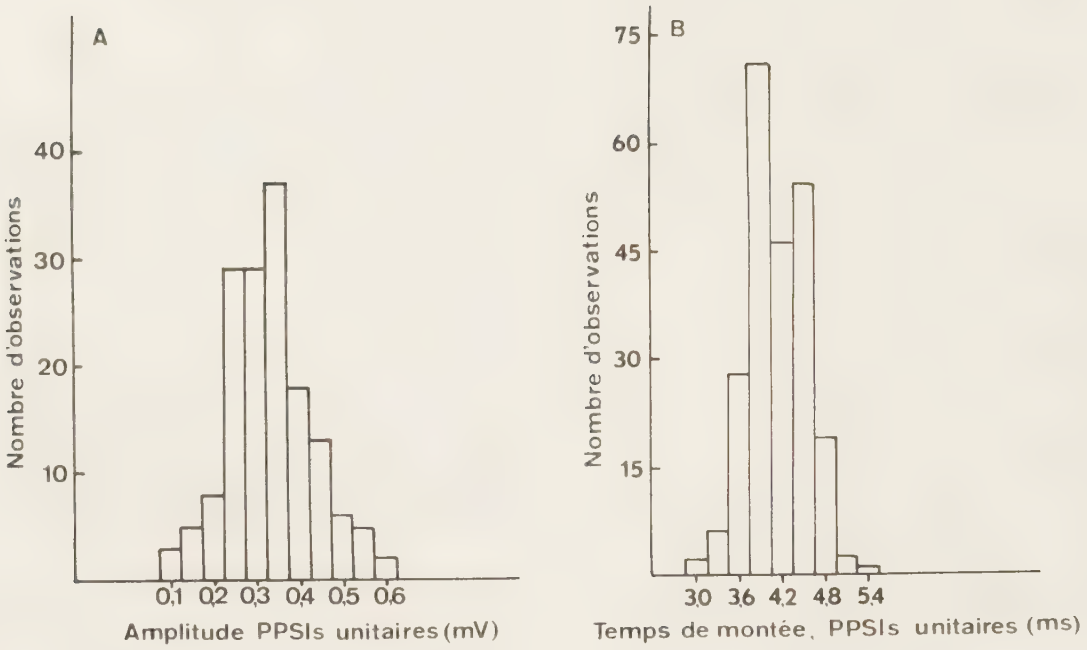


Fig. 29 - Histogrammes de répartition des amplitudes (A) et des temps de montée (B) de PPSIs unitaires liés à l'activité d'un seul neurone présynaptique (d'après le critère de fréquence). $[Ca^{++}]$ = 5,4 mM.

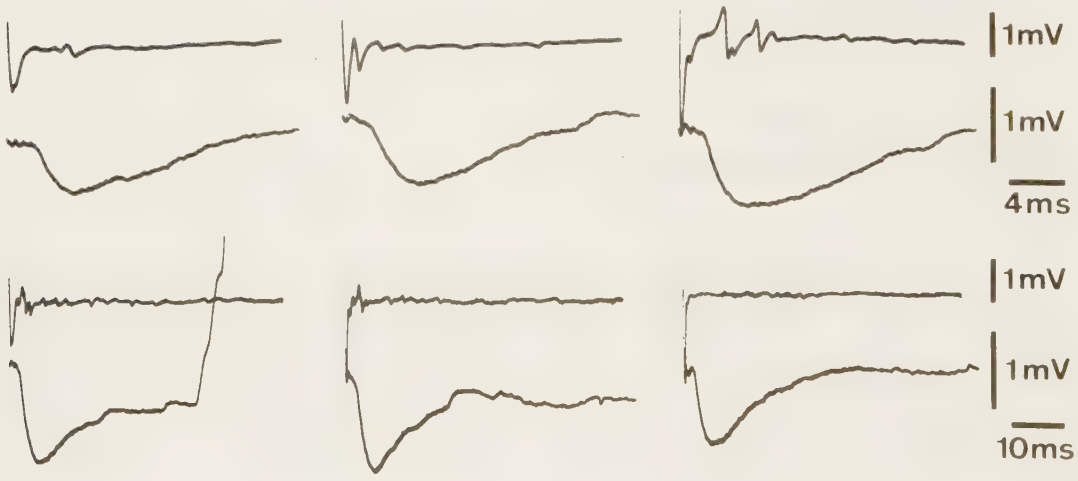


Fig. 30 - Exemples de PPSIs " unitaires " dus à l'activité de récepteurs cercaux non identifiés. Le potentiel d'action présynaptique (tracés du haut) dérivé par électrodes externes sur le nerf cercal X est utilisé pour déclencher le balayage. Il lui succède parfois d'autres potentiels d'action apparemment sans grande influence sur la fibre II interrogée.

b - PPSIs " unitaires " cercaux.

Une stimulation légère appliquée en divers endroits des cerques, de même qu'un très léger mouvement de l'un d'eux, peuvent être à l'origine, lorsque les nerfs X sont intacts, de réponses postsynaptiques hyperpolarisantes. Lorsque le stimulus est convenablement dosé, elles peuvent être réduites à un PPSI dont les caractéristiques de temps (durée totale, temps de montée et constante de temps) sont tout à fait comparables à celles des PPSIs unitaires " spontanés " (fig. 30). Seule l'amplitude est souvent un peu plus élevée (jusqu'à deux à trois fois) malgré leur apparition fréquente en " tout ou rien ". Il leur correspond sur le nerf cercal X un potentiel d'action ayant alors les caractéristiques d'un potentiel unique. Nous pouvons par conséquent affirmer que certains récepteurs cercaux induisent une activité inhibitrice postsynaptique que l'on peut enregistrer de manière quasi unitaire . Il se pourrait néanmoins que la réponse corresponde à la sommation de deux ou trois PPSIs impossibles à dissocier à cause de l'extrême sensibilité de ces récepteurs. La même réponse postsynaptique peut être obtenue par le moindre contact sur une zone relativement étendue du cerque et de son embase. La section totale du cerque ne supprime pas toujours ces PPSIs, ce qui laisse supposer que certains " récepteurs inhibiteurs " sont situés sur l'embase du cerque. Malheureusement leur extrême sensibilité ne nous a pas permis de les localiser avec plus de précision. Une étude de l'innervation sensori-motrice et des récepteurs de cette région nous semble par conséquent d'une grande importance .

Le délai entre le potentiel d'action enregistré sur le nerf cercal X aussi près que possible du ganglion et le début de la phase ascendante du PPSI unitaire est de 1,50 ms (1,35 à 1,60 ms), valeur qui peut être ramenée à 1,33 ms après correction, en tenant compte des mêmes facteurs que pour le PPSE unitaire (1,50 ms moins 0,17 ms = 1,33 ms). On peut noter que le délai de ces PPSIs " unitaires " est pratiquement deux fois plus élevé que celui des PPSEs unitaires (0,68 ms). Le schéma le plus simple qui puisse expliciter ces faits tient compte de l'existence d'un interneurone entre le "récepteur inhibiteur" et la fibre géante.

Tableau V : Caractéristiques des potentiels postsynaptiques unitaires.

	PPSEs unitaires		PPSIs unitaires	
	micro-électrode	oil-gap	micro-électrode	oil-gap
Amplitude (mV)	0,7 - 2,3	0,2 - 0,9 (m=0,5)	0,5 - 2	0,04 - 0,32 (m=0,2)
Temps de montée (ms)	0,9 - 1,3	1,7 - 3,3 (m=2)	2,7 - 3,3	3,0 - 5,2 (m=4)
Constante de temps (ms)	1,5 - 6,9	4 - 6	3 - 9	5,9 - 10,5
Durée totale (ms)	5 - 10	12 - 18	9 - 18	18,4 -21,5

Il se pose la question de savoir si ces interneurones sont les mêmes que ceux qui peuvent être mis en activité " spontanée " . Pour le moment, nous ne possédons aucun argument en faveur d'une telle hypothèse.

4 - Discussion

a - PPSEs unitaires .

Tous les PPSEs sont liés à l'activité mécanoréceptrice. Le délai moyen évalué à 0,68 ms ainsi que sa relative invariabilité constituent des arguments majeurs en faveur d'un relais monosynaptique. Autrement dit, de nombreux mécanorécepteurs cercaux sont en relation monosynaptique avec une seule fibre géante (1). Il serait intéressant d'établir la cartographie complète et la répartition des récepteurs en relation avec les fibres géantes. Bien que cette étude soit possible, nous ne l'avons pas entreprise; cependant,au cours de nos expériences,nous avons identifié avec certitude dix-huit mécanorécepteurs en relation avec la fibre II (médio-ventrale).

Nous avons observé que les PPSEs dus à l'activité d'un mécanorécepteur donné varient en amplitude (environ du simple au double), tandis que leurs temps de montée restent pratiquement constants. L'hypothèse la plus

(1) Signalons que leurs corps cellulaires sont tous situés dans le cerque, à la base des soies externes correspondantes.

simple qui paraît devoir expliquer ces observations est qu'une seule fibre cercale établisse plusieurs contacts synaptiques en différents endroits de l'arbre dendritique à des distances électrotoniques relativement constantes vis-à-vis du site d'enregistrement. Chacune de ces terminaisons secondaires donnerait lieu à des PPSEs élémentaires dont la sommation aboutirait à un PPSE unitaire. Des modifications dans la dispersion temporelle et spatiale de ces PPSEs élémentaires expliqueraient aussi bien les variations de forme que d'amplitude des PPSEs unitaires. L'amplitude d'un grand nombre de PPSEs unitaires, tous reliés à la même fibre géante, subit des variations encore plus sensibles (dans un rapport de 1 à 6 environ). Ces observations, compte-tenu des facteurs considérés ci-dessus, pourraient s'expliquer par une large distribution des terminaisons présynaptiques sur la surface réceptrice de l'ensemble de l'arbre dendritique.

Des PPSEs unitaires enregistrés par microélectrodes ont été décrits dans plusieurs préparations, notamment dans le motoneurone de Chat (KUNO, 1964 a ; BURKE, 1967), dans le ganglion abdominal de l'Aplysie (TAUC, 1958 ; GERSCHENFELD, ASCHER et TAUC, 1967; CASTELLUCCI, PINSKER, KUPFERMANN et KANDEL, 1970) ou dans le neuropile du ganglion A_6 de *Periplaneta americana* (CALLEC et BOISTEL,1966 a); mais à notre connaissance, aucune d'entre elles ne permet de contrôler les afférences au niveau même des récepteurs périphériques. Notre préparation, en favorisant un tel contrôle, peut ainsi fournir d'utiles indications sur les relations précises entre l'activité d'un seul récepteur identifiable et son influence au niveau du premier relais synaptique, lui-même repérable et contrôlable (la fibre géante). En d'autres termes, nous pensons pouvoir étudier comment s'opèrent les premières transformations d'un message sensoriel, ou encore comment est intégrée cette information. C'est ce que nous essayerons de voir dans les prochains chapitres.

b - PPSIs unitaires.

Des PPSIs unitaires ont déjà été rencontrés dans d'autres préparations par exemple chez l'Aplysie (TAUC, 1958 ; TAUC et GERSCHENFELD, 1962) et dans des motoneurones de Grenouille (KATZ et MILEDI, 1963) .

Chez les Insectes, nous possédons très peu de données sur l'inhibition dans les ganglions du système nerveux. Toutefois nous avons pu enregistrer,

rarement, des PPSIs unitaires par microélectrode dans le neuropile (fig. 4) ou dans des corps cellulaires non identifiés (observations non publiées). Dans ce dernier cas, ils ont également été observés par KERKUT, PITMAN et WALKER(1969b).C'est là encore un avantage de notre préparation que d'avoir pu rattacher des PPSIs à une activité réceptrice dont la localisation est malheureusement encore imprécise. L'action de ces récepteurs se fait sentir par l'intervention vraisemblable de neurones intraganglionnaires . Nous n'avons pas pu localiser, même approximativement, la position de leurs corps cellulaires. Cependant nous avons vu que certains corps cellulaires du ganglion A_6 (voir fig. 3) peuvent être l'objet d'une activité plus ou moins rythmique. Il n'est pas inconcevable d'admettre qu'ils puissent, au moins en partie, appartenir à des interneurones inhibiteurs des fibres géantes. Ils pourraient être mis en activité soit par des excitations mécaniques au cours des diverses manipulations, soit par des variations de pression osmotique (en particulier au cours de la dissection), et seraient par conséquent à l'origine des PPSIs unitaires " spontanés " plus ou moins rythmiques déjà décrits plus haut. Cette opinion est renforcée par le fait que l'incision de la gaine en cours d'enregistrement,la mise en mouvement du milieu baignant le ganglion (par barbotage de gaz, par exemple) ou l'addition de glucose (2 g/L) entraînent parfois l'apparition de PPSIs unitaires. Dans ces différents cas, les corps cellulaires seraient préalablement silencieux.

Nous avons observé, en outre, que l'addition de chlorure de choline (5.10^{-4} g/ml) déclenche également (dans 7 expériences sur 7) des PPSIs unitaires qui persistent tant que le ganglion est baigné par ce milieu. La fréquence de ces PPSIs est sensiblement constante et ils semblent n'appartenir qu'à un petit nombre d'interneurones, voire même à un seul, dans la plupart des cas. Ce rôle particulier de la choline mériterait d'être approfondi, car il apparaît comme remarquablement spécifique. Elle n'induit jamais de PPSEs unitaires, ce qui semble exclure, par comparaison, une action sur les terminaisons présynaptiques inhibitrices, à moins que ces dernières ne présentent des propriétés membranaires différentes de celles des terminaisons excitatrices (les corps cellulaires des fibres à l'origine des PPSEs sont en effet au niveau cercal). Cette hypothèse n'est pas à rejeter, *a priori*, mais il paraît plus vraisemblable d'admettre que la choline agit au niveau des corps cellulaires des interneurones inhibiteurs, corps cellulaires qui pourraient être activés par

une action spécifique sur leur membrane. Les effets particuliers de la choline ne sont pas contraire à l'idée que les PPSEs sont bien dus à la mise en jeu d'un relais monosynaptique et que les PPSIs ont pour origine des interneurones inhibiteurs intraganglionnaires. Nous pouvons poser comme hypothèse de travail que leurs corps cellulaires sont dans certains cas excitables et situés dans la région médio-dorsale du ganglion (seule région contenant des corps cellulaires excitables). Cette hypothèse demande évidemment confirmation. Nous avons vainement essayé de localiser de tels corps cellulaires par micro-électrodes, tout en enregistrant simultanément au niveau postsynaptique.

L'examen du tableau V appelle quelques observations. Nous y avons rassemblé les principales caractéristiques des deux types de potentiels postsynaptiques (PPSEs et PPSIs unitaires) obtenus dans le ganglion A_6 à partir des deux techniques différentes que nous avons employées (par micro-électrode et électrodes externes : " oil-gap "). Ces valeurs ne permettent pas une comparaison absolue car l'identification d'une fibre géante après empale-ment par la microélectrode n'est pas certaine. Cependant on peut dégager deux points principaux:

- l'amplitude des potentiels enregistrés par " oil-gap " est toujours bien plus faible que par microélectrode,
- et les trois caractéristiques de temps sont toutes multipliées par un facteur voisin de deux.

Ces observations confirment la nature locale des PPSEs et PPSIs unitaires. Ils subissent les effets d'une dissipation électrotonique d'autant plus importante que le site d'enregistrement est plus éloigné. En outre, qu'ils soient enregistrés avec l'une ou l'autre des deux techniques, les PPSIs uni-taires sont toujours plus faibles et durent plus longtemps que les PPSEs. Il y a deux explications possibles:

- les PPSIs naissent dans le ganglion en une région postérieure à celle des PPSEs. Ils subiraient alors un décrément électrotonique plus important, ce qui peut jouer à la fois sur leur amplitude et leurs caractéristiques de durée;
- le médiateur des PPSIs est différent de celui des PPSEs et est à l'ori-gine de réactions chimiques à cinétique plus lente.

B - POTENTIELS POSTSYNAPTIQUES RESULTANT DE LA STIMULATION SYNCHRONE OU ASYNCHRONE D'UN NOMBRE PLUS OU MOINS GRAND D'ELEMENTS PRESYNAPTIQUES.

Tels que nous les avons présentés et définis, les PPSEs et les PPSIs unitaires constituent les éléments de base essentiels, chacun d'eux correspondant à un potentiel d'action présynaptique. On peut s'attendre à ce que la fibre géante fasse le bilan de ces diverses informations et que la résultante soit une fonction qualitative et quantitative des récepteurs mis en jeu. Si notre hypothèse est valable, nous devons pouvoir observer des potentiels postsynaptiques excitateurs ou inhibiteurs plus ou moins amples, en fonction de la stimulation d'un nombre plus ou moins élevé de récepteurs ou de fibres cercales de chaque catégorie. Cette stimulation peut s'effectuer de manière asynchrone (stimulation mécanique par souffle d'air appliqué sur les cerques par exemple) ou synchrone (stimulation électrique des différents nerfs cercaux). Nous avons vu , dans le chapitre précédent,que la majorité des afférences excitatrices (à l'origine des PPSEs unitaires) sont convoyées par les nerfs XI auxquels nous donnerons le nom de " nerfs excitateurs ". Par contre les nerfs X transportent la majorité des afférences inhibitrices (PPSIs unitaires) ; nous pouvons par conséquent leur accorder le nom de " nerfs inhibiteurs ". L'étude de l'inhibition et de l'excitation peut ainsi se faire séparément sur l'un ou l'autre de ces nerfs. Dans ce cas, on sectionne les nerfs que l'on désire rendre inopérants.

1 - Effets dus à la stimulation mécanique des récepteurs cercaux.

a - Effets transmis par les nerfs XI.

La stimulation mécanique des cerques est illustrée par la fig. 31. Un souffle d'air de moyenne intensité déclenche une réponse postsynaptique complexe (fig. 31 A); elle correspond à la sommation de nombreux PPSEs unitaires. Cette réponse est sans aucun doute déterminée par la mise en jeu

d'un certain nombre de mécanorécepteurs. Un souffle d'air plus fort est suivi par une dépolarisation encore plus importante qui, dans ce cas, est suffisante pour induire deux potentiels d'action propagés (fig. 31 B). Notons que certains PPSEs sont vraisemblablement juste sous-liminaires. Un souffle d'air encore plus fort et prolongé nous a permis quelquefois d'accroître le nombre de réponses propagées (6 potentiels d'action au maximum). On peut parfois observer des PPSIs unitaires mêlés aux réponses dépolarisantes composites (fig. 32). Ces PPSIs se présentent quelquefois sous forme de salves dont la durée peut excéder celle de la dépolarisation (fig. 32 B). A la suite d'une stimulation mécanique relativement brève, la dépolarisation initiale est souvent accompagnée par une composante hyperpolarisante de durée relativement longue (fig. 33). Nous retrouverons une telle hyperpolarisation au cours de la stimulation naturelle unitaire de certains récepteurs. (voir fig. 50).

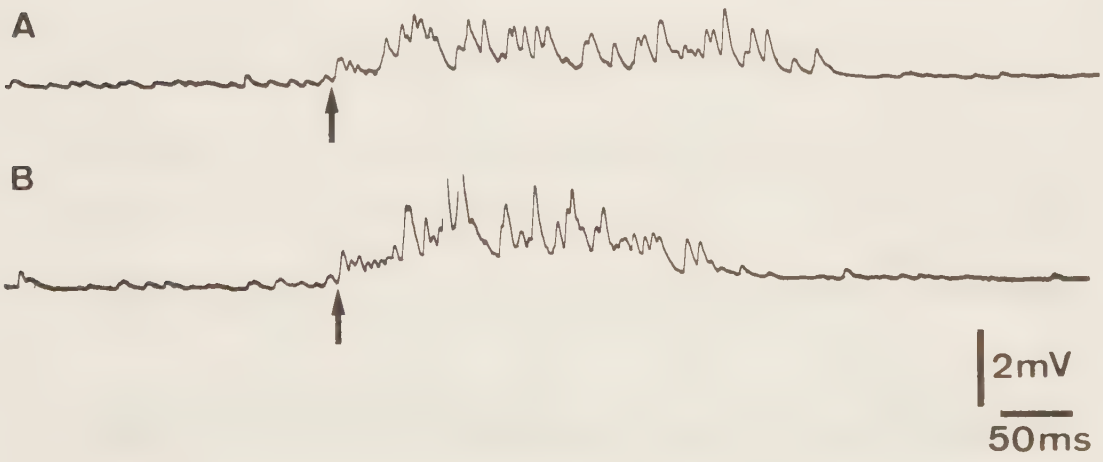


Fig. 31 - Réponses postsynaptiques induites par une stimulation mécanique (souffle d'air) appliquée sur les cerques et débutant à l'endroit marqué d'une flèche (nerfs XI seuls intacts). La dépolarisation obtenue est due à la sommation de nombreux PPSEs unitaires, eux-mêmes liés à l'activité des mécanorécepteurs cercaux stimulés par le souffle d'air. Une stimulation suffisamment forte est capable d'engendrer en B, deux potentiels d'action propagés. $[Ca^{++}]$= 1,8 mM.

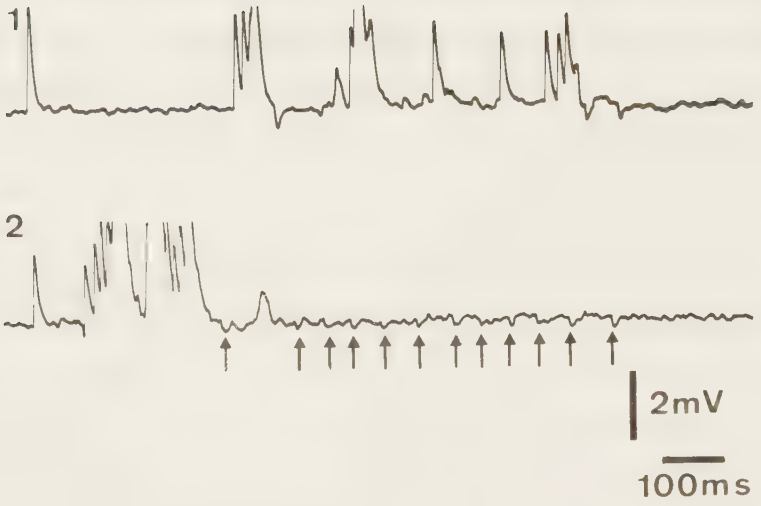


Fig. 32 - Réponses postsynaptiques dépolarisantes (voir fig. 31) accompagnées de PPSIs unitaires (nerfs XI seuls intacts). En B, les PPSIs se présentent en une volée dont la durée excède celle de la dépolarisation (flèches). $[Ca^{++}]$ = 5,4 mM.

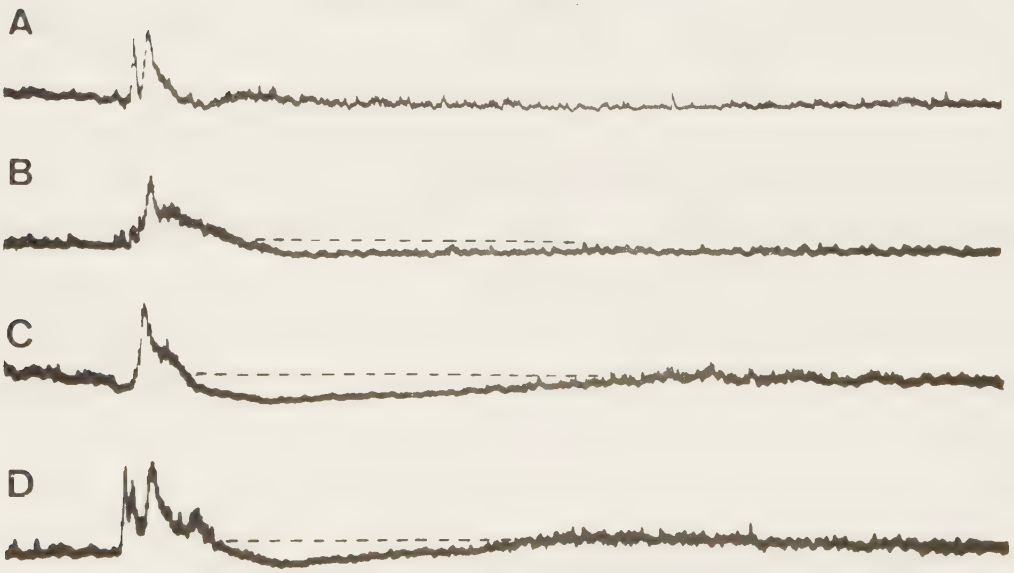


Fig. 33 - A à D : exemples de composantes hyperpolarisantes de longue durée succédant parfois à la phase dépolarisante induite par la stimulation mécanique des cerques (souffles d'air). La ligne pointillée représente le niveau de repos.

b - Effets transmis par les nerfs X.

La fig. 34 représente des bouffées de potentiels enregistrées sur le le nerf X homolatéral, auxquelles succèdent, au niveau postsynaptique, des réponses complexes comportant toujours une phase hyperpolarisante plus ou moins ample suivie le plus souvent par une phase dépolarisante de forme très variable. L'hyperpolarisation peut être obtenue isolément pour une stimulation mécanique ménagée (voir fig. 30). La dépolarisation précède parfois, mais assez rarement, l'hyperpolarisation. Le nerf X comporte par conséquent des fibres inhibitrices et excitatrices. Les réponses dépolarisantes tardives proviennent peut-être de la mise en jeu de circuits complexes.

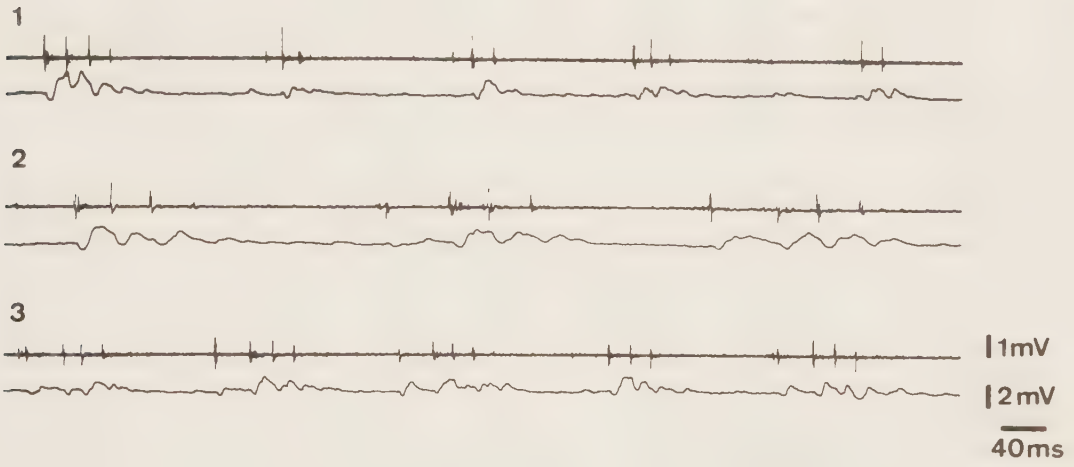


Fig. 34 - Réponses postsynaptiques composites transmises par les nerfs X. La stimulation mécanique de certaines régions cercales (par micropipette) évoque des bouffées de potentiels d'action (tracés du haut) auxquelles correspondent postsynaptiquement (tracés du bas) une composante hyperpolarisante précédant une composante dépolarisante plus complexe.

2 - Effets dus à la stimulation électrique des nerfs cercaux

a - Stimulation des nerfs XI .

α - Réponse initiale (= réponse monosynaptique).

Sous l'effet de stimulations d'intensité croissante portées sur le nerf cercal homolatéral, on observe une dépolarisation qui augmente graduellement en amplitude (fig. 35). Cette réponse est absolument comparable en forme et en durée aux PPSEs unitaires. Elle s'explique par la sommation synchrone de PPSEs unitaires dus au recrutement progressif des fibres cer-

cales aux cours des stimulations successives. Il en résulte que le nombre de récepteurs en relation avec cette fibre géante est relativement élevé. Il est difficile de l'évaluer par la méthode des seuils car les fibres cercales ont des diamètres sensiblement égaux. On peut donner le nom de PPSE à cette dépolarisation (1).

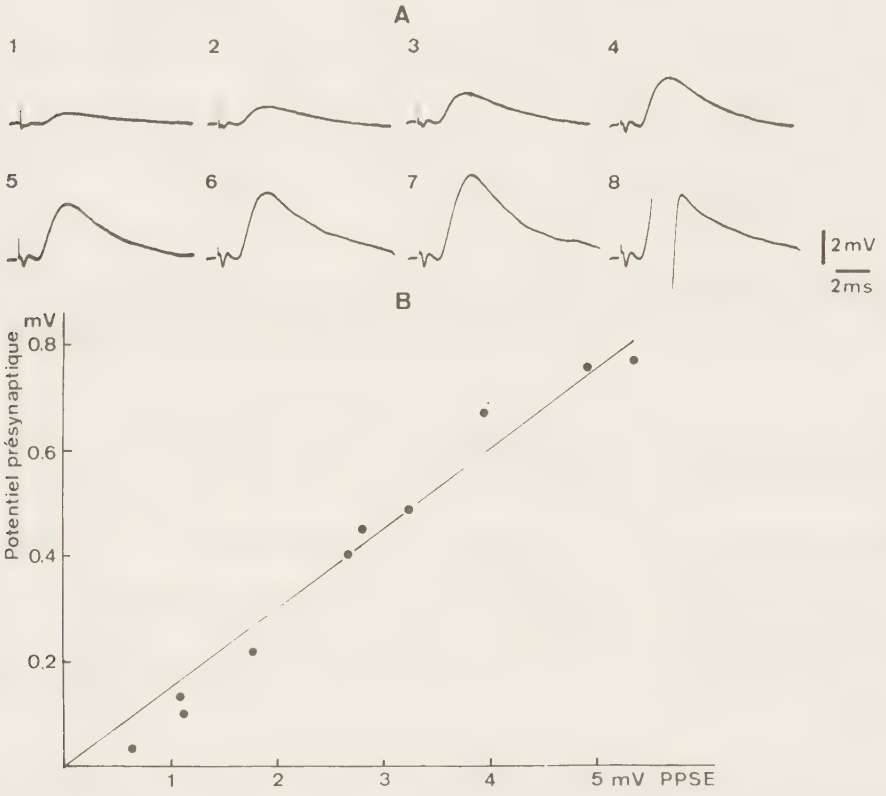


Fig. 35 - Evolution de la réponse postsynaptique ("PPSE évoqué") succédant à la stimulation électrique croissante du nerf cercal XI homolatéral. Le PPSE s'accroît très progressivement avec l'intensité de stimulation et déclenche un potentiel d'action propagé (photo n°8) lorsqu'il atteint le seuil. Il est précédé par un petit potentiel biphasique qui représente la manifestation électrotonique du potentiel cercal présynaptique et qui s'accroît linéairement avec le PPSE (B).

(1) Dans certains cas, nous l'appellerons " PPSE évoqué ", par analogie avec l'expression anglaise " evoked EPSP ". Cette expression nous paraît assez mal choisie, mais nous la conserverons pour éviter de multiplier les synonymes. Elle indiquera uniquement la résultante d'une sommation synchrone de nombreux PPSEs unitaires. Cette remarque s'applique également au " PPSI évoqué ".

Lorsque son amplitude atteint une certaine valeur qui varie de 4 à 10 mV suivant les expériences (le seuil), il donne naissance à un potentiel d'action propagé, dont l'amplitude est comprise entre 90 et 120 mV (fig. 36). Il possède les caractéristiques classiques des potentiels d'action décrits par d'autres auteurs dans le cas d'axones géants de *Periplaneta americana* (BOISTEL et CORABOEUF,1954 a; YAMASAKI et NARAHASHI , 1959 b; PICHON, thèse 1969).

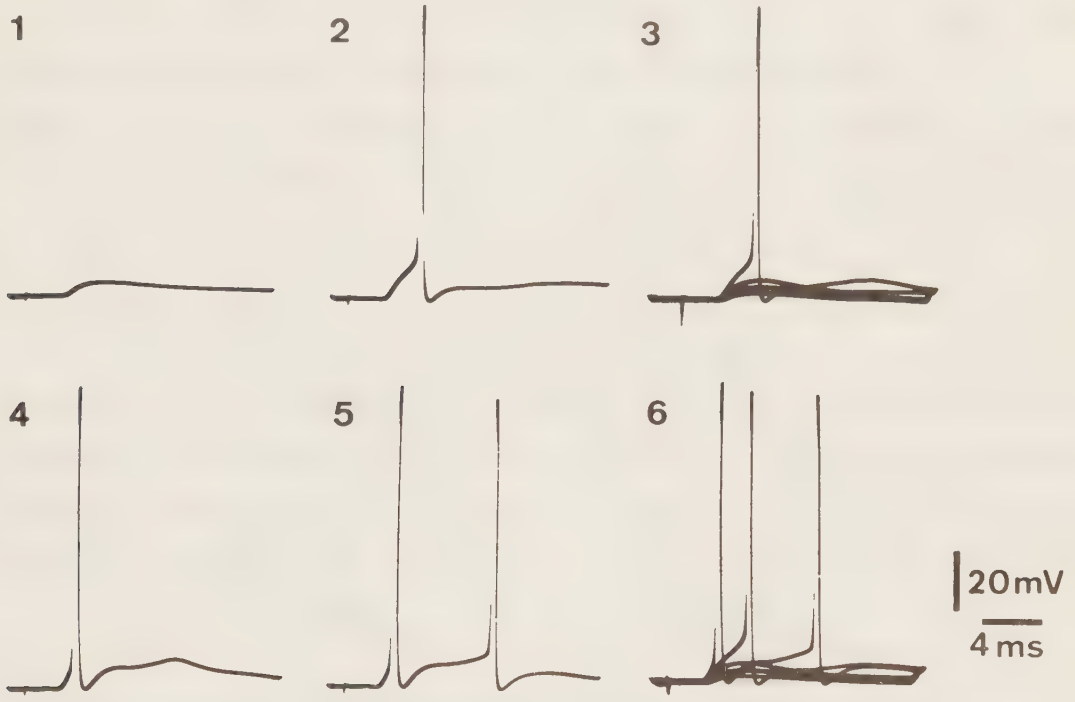


Fig. 36 - Potentiels postsynaptiques et potentiels d'action déclenchés par la stimulation électrique du nerf XI homolatéral.
1 - Stimulation sous-liminaire : PPSE seul
2 - Stimulation juste liminaire : un potentiel d'action se greffe sur le PPSE.
3 - Superposition de PPSEs au cours de stimulations d'intensité croissante. Au seuil apparaît le potentiel d'action et une réponse retardée.
4 - Pour une intensité plus forte apparaît un PPSE retardé qui peut engendrer un potentiel d'action (5).
6 - Noter la diminution du délai du potentiel d'action initial au cours de stimulations d'intensité croissante (réponse comportant le potentiel d'action retardé).

Le PPSE est toujours précédé par un petit potentiel qui s'accroît également avec l'intensité de stimulation. Il existe une relation pratiquement linéaire entre l'accroissement en amplitude de ce potentiel et du PPSE (fig. 35 B). Il s'agit donc vraisemblablement de l'enregistrement électrotonique du potentiel cercal (présynaptique). Il semble que ce soit là le seul couplage électrotonique entre les fibres cercales et la fibre géante.

Le délai synaptique peut être mesuré avec une précision relativement bonne entre ce potentiel électrotonique et le début du PPSE. Dans cet exemple, il est compris entre 0,83 et 0,91 ms. Bien que dans certaines expériences, très peu nombreuses d'ailleurs, on ait pu noter des délais plus élevés (allant jusqu'à 1,73 ms), nous pensons qu'il est assez court et suffisamment constant pour appuyer l'hypothèse d'un relais monosynaptique pour toutes les fibres cercales en relation avec cette fibre géante, ce qui confirme les résultats obtenus sur les PPSEs unitaires.

La stimulation du nerf cercal contralatéral donne également un PPSE tout à fait comparable, ce qui signifie que de nombreuses fibres cercales ont des connexions avec la fibre géante du côté opposé. Cependant, il ne peut engendrer de potentiel d'action propagé.

Si on accroît davantage la stimulation appliquée sur les nerfs cercaux homolatéraux, la pente du PPSE monosynaptique s'accentue. Ainsi le seuil est plus aisément atteint, ce qui a pour conséquence de diminuer le délai du potentiel d'action bien que le délai du PPSE ne varie pas (fig. 36). Ce même PPSE peut alors engendrer un deuxième potentiel d'action plus petit et séparé du premier par un délai minimum de 1,7 ms (ce délai correspond à la période réfractaire relative minimum de la fibre géante, à la température de la pièce).

β - Réponses retardées.

Dans les meilleures conditions physiologiques et après une longue période de repos, le nerf XI homolatéral stimulé électriquement peut être à l'origine de deux ondes dépolarisantes supplémentaires. La première, dont le délai oscille entre 10 et 20 ms, s'accroît graduellement avec la stimulation (fig. 36 et 37) et peut déclencher (mais très rarement) un potentiel d'action propagé (fig. 36, photo n°5). Ce PPSE est extrêmement labile et s'annule à la suite de quelques stimulations à une fréquence relativement faible (5 à 10 par seconde) (fig. 37 B, 1 et 2). Au cours de nombreuses stimulations successives à faible fréquence (1 / 10 secondes) , on peut observer une variation très nette de son délai, variation qui paraît évoluer par paliers plus ou moins réguliers (fig. 38). Ces potentiels pourraient représenter la manifestation fonctionnelle de circuits neuroniques complexes comportant, soit des interneurones supplémentaires, soit des " boucles " agencées en circuit réverbérant (WALL, 1959; PRESTON et KENNEDY, 1962). Ce délai pourrait

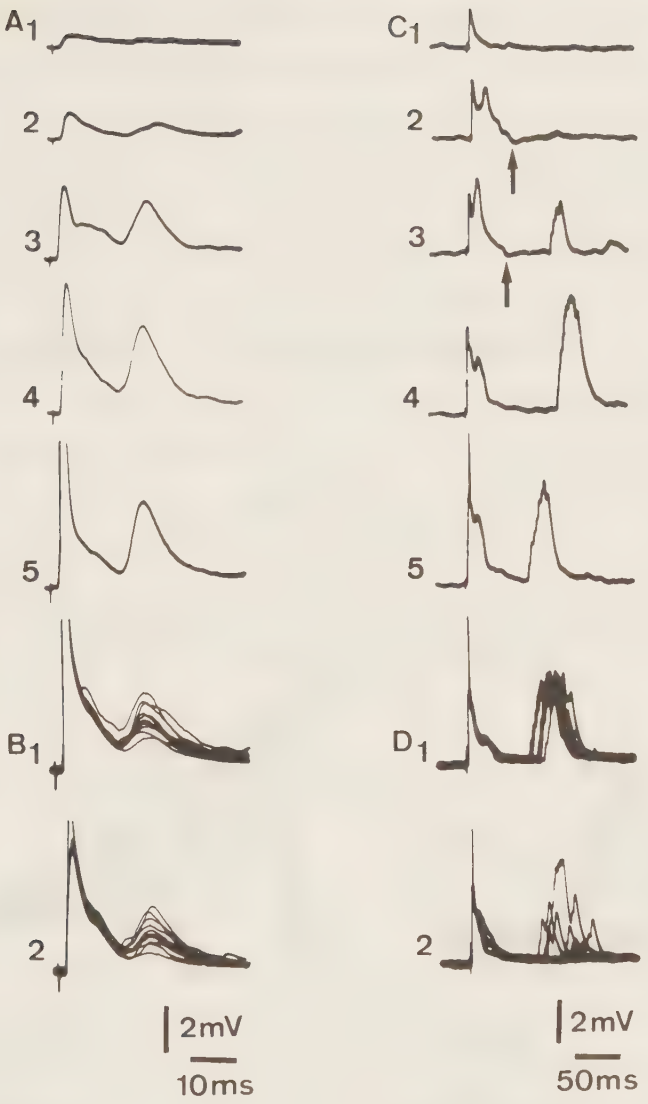


Fig. 37 - Evènements postsynaptiques induits par la stimulation électrique croissante du nerf XI homolatéral.

A - réponses postsynaptiques complexes comprenant le PPSE monosynaptique initial (voir texte) et un premier PPSE retardé (délai 10 à 20 ms). Tous les deux s'accroissent progressivement en amplitude. Le PPSE initial engendre un potentiel propagé en A_5. Le PPSE retardé peut quelquefois induire également un potentiel d'action (voir fig. 36).

B - effets de la stimulation répétitive sur ce PPSE complexe. A des fréquences de 5 par seconde (B_1), ou 10 par seconde (B_2), le PPSE monosynaptique ne montre qu'une fatigue limitée alors que le PPSE retardé est extrêmement labile.

C - des enregistrements effectués à une vitesse de balayage plus lente démontrent l'apparition, au cours d'une stimulation croissante, d'une deuxième réponse retardée (délai = 50 à 100 ms). Noter la présence d'un petit PPSI retardé (flèches) qui semble dû à la stimulation électrique.

D - le délai de la deuxième réponse varie considérablement, ce qui est bien visible en D_1 (stimulation à fréquence faible: 1/10 secondes). A fréquence plus élevée (D_2: 5 par seconde), la réponse s'estompe et s'annule très rapidement.

également s'expliquer par une vitesse de conduction plus lente dans certaines fibres cercales. Il semble cependant que l'homogénéité relative des diamètres de toutes les fibres du nerf cercal exclut cette hypothèse.

La deuxième dépolarisation est bien séparée des premières, le délai étant compris entre 50 et 100 ms. Son amplitude est plutôt liée à la fréquence qu'à l'intensité de stimulation. Elle présente des crénelures régulières qui suggèrent la sommation de PPSEs unitaires (fig. 37 C, 4 et 5). Son délai global est également variable, même pour des fréquences faibles (1/10 secondes), (fig. 37 D, 1). Elle disparaît rapidement pour des fréquences plus élevées (5 par seconde), (fig. 37 D, 2). Elle n'engendre jamais de potentiel d'action propagé et le problème de son rôle physiologique reste posé.

En plus de ces trois catégories de potentiels postsynaptiques (compte-tenu du PPSE initial),d'autres dépolarisations intermédiaires apparaissent quelquefois, mais avec beaucoup moins de régularité.

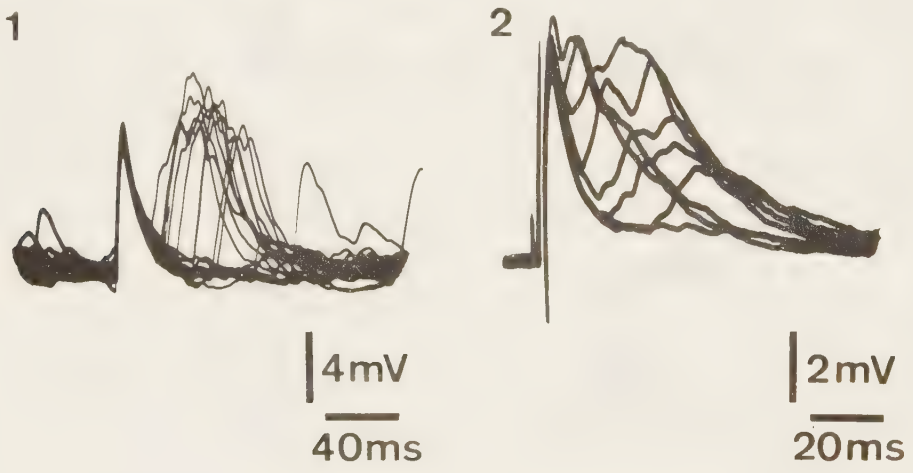


Fig. 38 - Variabilité du délai du premier PPSE retardé. Le nerf cercal XI homolatéral est stimulé à une fréquence faible (1 / 10 secondes) , pour éviter toute fatigue du PPSE monosynaptique. Noter, dans ces deux exemples obtenus à partir de deux expériences différentes, l'évolution du délai, par paliers relativement réguliers.

Nous pouvons également noter la présence fréquente d'un PPSI d'apparence unitaire entre les deux dépolarisations retardées (fig. 37 C) et plus rarement d'une salve de PPSIs unitaires succédant à la stimulation des nerfs XI homo-et contralatéraux (fig. 39). La succession de tous ces divers évènements se résume sur la fig. 37 C, 3 . Malheureusement, ils ne sont pas aisément contrôlables, aussi avons-nous uniquement centré notre étude

sur le PPSE initial, monosynaptique. Ils apportent néanmoins quelque idée sur l'extrême complexité de ce système.

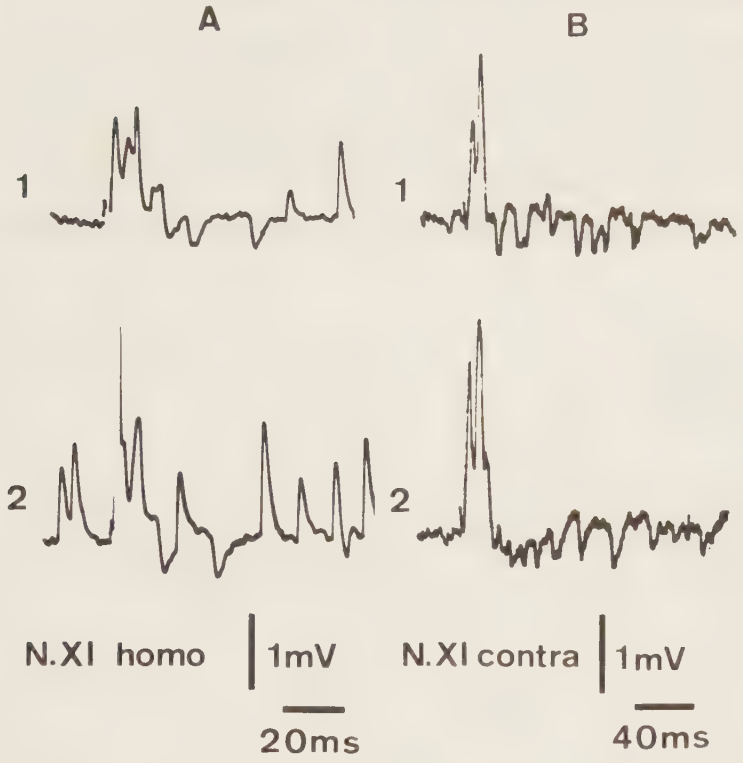


Fig. 39 - Exemples de PPSIs unitaires obtenus par la stimulation électrique des nerfs XI homo-(A) et contralatéraux (B). De telles réponses sont à rapprocher de celles qui succèdent parfois à la stimulation mécanique. (voir fig. 32).

Des réponses retardées avaient déjà été signalées par YAMASAKI et NARAHASHI (1960) sur le même ganglion avec un délai de 30 à 70 ms. Elles pourraient correspondre à nos réponses les plus tardives. La correspondance est cependant difficile du fait qu'elles ont été dérivées sur l'ensemble des fibres composant les connectifs. Cette étude à été reprise récemment, toujours sur la même préparation, par microélectrodes intracellulaires placées dans les fibres géantes aussi près que possible du ganglion A_6 (HARRIS, 1969 ; HARRIS et SMYTH, 1971 a). Ces auteurs ont pu obtenir jusqu'à trois potentiels d'action retardés, alors que nous n'avons jamais pu en obtenir plus de un . Le temps de latence de ces potentiels d'action varie entre 13 et 34 ms. Ces réponses pourraient donc correspondre à notre premier PPSE retardé dont le délai oscille entre 10 et 20 ms. La réponse retardée observée par ces auteurs reste suffisamment stable en délai (variations de 5 ms au maximum) malgré la variation en fréquence ou en intensité de la stimulation. Au contraire, nos résultats établissent que le délai varie considé-

rablement et que la réponse est extrêmement labile. Il s'agit peut-être là de fibres différentes. Plus vraisemblablement, notre contrôle du PPSE nous permet des mesures plus précises du délai alors que le contrôle sur potentiel d'action, phénomène en tout ou rien, est nécessairement moins précis. Il varie en effet avec le nombre de fibres afférentes recrutées (voir fig. 36). Ces phénomènes retardés ont souvent un seuil plus élevé que celui des PPSEs monosynaptiques ou des PPSIs, ce qui nous a permis, dans la plupart des cas, de pouvoir éviter leurs interactions et ainsi de porter notre étude essentiellement sur le système défini plus haut.

b - Stimulation des nerfs X .

La stimulation électrique croissante des nerfs X homo-et contralatéraux donne, dans les deux cas (fig. 40), naissance à une onde hyperpolarisante dont l'amplitude s'accroît progressivement et peut atteindre au maximum 4 mV.

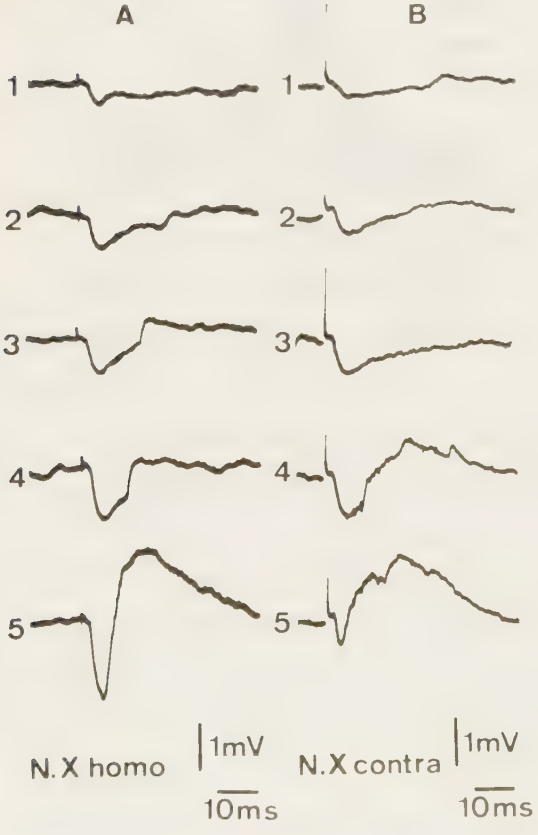


Fig. 40 - Effets inhibiteurs dus à la stimulation électrique croissante des nerfs X homo- (A) et contralatéral (B). Le PPSI augmente progressivement; il est parfois suivi d'une composante dépolarisante. Plus rarement, il est précédé par un PPSE monosynaptique (voir fig. 41 C).

Ces données indiquent l'existence de plusieurs fibres inhibitrices de la fibre géante II, en provenance des deux régions cercales. Les caractéristiques temporelles de cette onde sont tout à fait comparables à celles des PPSIs unitaires. Nous l'appellerons PPSI (ou PPSI évoqué) pour les mêmes raisons retenues plus haut quant à la dénomination du PPSE.

Cette onde est fréquemment suivie par une dépolarisation dont l'amplitude croît aussi progressivement. Elle apparaît complexe et de délai variable (fig. 40 A, 4 et 5 ; B, 4 et 5).

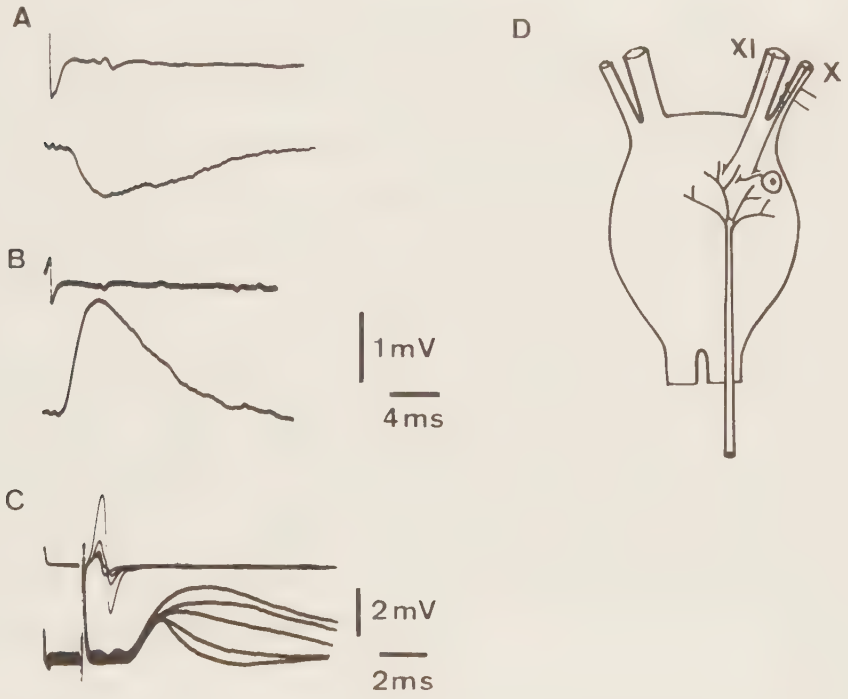


Fig. 41 - Délais synaptiques .

A - PPSI " unitaire " cercal transmis par le nerf X homolatéral. Le délai, mesuré entre le potentiel d'action dérivé aussi près que possible de l'entrée dans le ganglion (tracé du haut) et la base du PPSI, atteint en moyenne 1,33 ms.

B - PPSE unitaire cercal transmis par le nerf XI homolatéral. Dans les mêmes conditions, le délai du PPSE est en moyenne de 0,68 ms.
Noter la présence d'un petit potentiel électrotonique précédant le PPSE, et peut-être deux potentiels précédant le PPSI; ils correspondent aux potentiels présynaptiques cercaux.

C - La stimulation électrique croissante du nerf X homolatéral entraîne tout d'abord l'apparition d'un PPSE (tracé du bas) dont le délai est très voisin de celui du PPSE unitaire sur lequel se greffe un PPSI de délai approximativement deux fois plus élevé.
Ces expériences explicitent la nature monosynaptique de toutes les afférences excitatrices et appuient fortement l'hypothèse d'un relais disynaptique pour toutes les afférences inhibitrices (D).

Ce PPSI est aussi précédé par un PPSE dont le délai, identique à celui du PPSE initial du nerf XI, suggère sa nature monosynaptique (fig. 41, C). Cependant, les seuils relatifs de ces PPSE et PPSI sont variables, ce qui permet d'obtenir le plus souvent le PPSI pour un seuil plus faible que celui du PPSE. Le résultat semble essentiellement dépendre de la position précise du nerf sur les électrodes excitatrices. Le délai du PPSI évoqué est identique à celui des PPSIs " unitaires cercaux ".

La fig. 41 récapitule les données concernant les délais synaptiques d'un PPSI " unitaire " cercal (A), d'un PPSE unitaire (B) et d'un PPS biphasique (C). Les deux PPS unitaires choisis nous permettent d'observer un petit potentiel présynaptique, conduit électrotoniquement, qui précède les potentiels postsynaptiques. Notons qu'il est à peine discernable du bruit de fond. En C, la stimulation progressive du nerf X homolatéral (marqué par l'enregistrement du potentiel présynaptique sur le tracé du haut) déclenche tout d'abord l'apparition d'un PPSE, puis celle d'un PPSI qui vient se greffer sur lui, à mi-distance de son temps de montée. Dans les deux cas, le délai du PPSI, qu'il soit unitaire ou évoqué, est pratiquement double de celui du PPSE. Ces données nous ont conduit à formuler l'hypothèse que les afférences excitatrices s'articulent monosynaptiquement sur la fibre géante, tandis que les afférences inhibitrices le font de manière disynaptique, ce qui nécessite l'intervention d'un interneurone intraganglionnaire (D).

C - POTENTIELS D'INVERSION DES PPSEs ET DES PPSIs .

1 - Relation voltage-courant.

L'application d'un courant électrique à l'élément postsynaptique (la fibre géante) permet, par l'analyse du comportement membranaire, de préciser certaines caractéristiques intéressantes de son fonctionnement. Selon le schéma d'équivalence électrique de la fig. 16, le courant appliqué traverse toute la masse cytoplasmique de la fibre géante étant donné que, d'une part la résistance interne est relativement faible par rapport à la résistance membranaire et que d'autre part le facteur externe de court-circuit est négligeable au niveau de "l'oil-gap" . Le courant peut intéresser par conséquent toute la zone synaptique (arbre dendritique) ainsi que le départ de l'axone géant jusqu'à la portion de fibre isolée, plongée dans l'huile. Dans ces conditions il paraît difficile de dégager les effets propres du courant sur la membrane synaptique, ce qui donne lieu à certaines difficultés d'interprétation. Cependant il est possible d'admettre, avec une bonne approximation,que le comportement membranaire de l'axone est constant jusqu'à la base de l'arbre dendritique (segment intégrateur), ce qui permet, en opérant par comparaison, de dégager les effets spécifiques du courant électrique au niveau synaptique.

Les relations voltage-courant de la partie axonique des fibres géantes ont été établies par plusieurs auteurs (NARAHASHI, 1961; PICHON, thèse 1969). Il a été démontré que les potentiels électrotoniques obtenus pour des chocs de courant rectangulaires dépolarisants ou hyperpolarisants, sont symétriques pour de faibles intensités. Si on augmente l'intensité, cette symétrie disparaît; il apparaît une diminution très nette de la résistance membranaire pour des chocs dépolarisants relativement longs: c'est le phénomène décrit sous le nom de rectification retardée (COLE, 1941). Par contre pour des chocs hyperpolarisants, la courbe, d'abord linéaire (jusqu'à ce que l'hyperpolarisation atteigne environ -30 mV), est suivie par une légère augmentation de la résistance jusqu'à -90 mV environ (NARAHASHI, 1961).

La fig. 42 illustre les relations voltage-courant de notre préparation " ganglion A_6 - fibre isolée ". Le montage en pont de Wheatstone que nous avons utilisé pour l'application des courants a été adapté à la fibre géante de la Blatte par YAMASAKI et NARAHASHI (1959 b). La courbe ainsi obtenue présente de nombreuses analogies avec celle de YAMASAKI et NARAHASHI. Il est rarement possible de dépolariser de plus de 15 à 20 mV et l'on note également une légère augmentation de la résistance entre -30 et -90 mV.

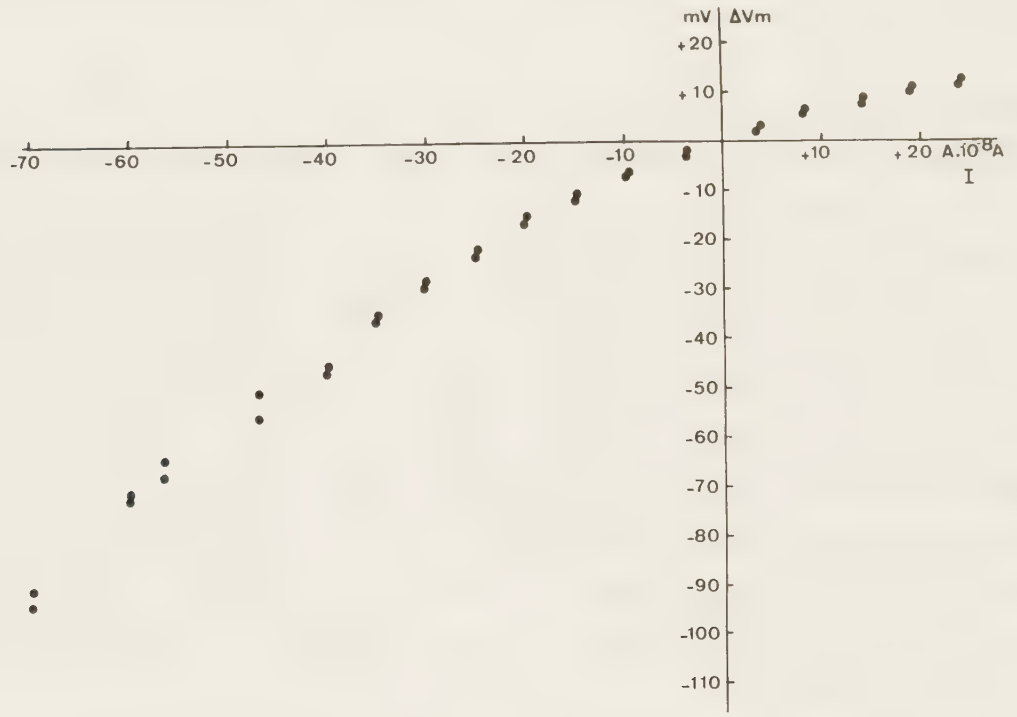


Fig. 42 - Relations voltage-courant obtenues sur la préparation " ganglion A_6 - fibre géante isolée " . ΔVm est mesuré selon la technique décrite dans la fig. 18 A, au cours de la phase stable d'un choc électrotonique de 100 ms environ. I est mesuré à partir de la chute de tension développée aux bornes de la résistance R_5 (fig. 17).

Il est intéressant de retenir que la courbe présente une portion rectiligne sur une trentaine de mV (entre +2 et -30 mV), au cours de laquelle la préparation se comporte comme une résistance ohmique. En d'autres termes, la partie axonique de la préparation ne subit pas de variations de la conductance membranaire dans cette tranche de potentiel. Dans certains cas, cela peut permettre par comparaison:

1° - de localiser une variation de conductance éventuelle au niveau synaptique et

2° - de rendre plus aisée l'étude de l'évolution des PPSEs et des PPSIs sous l'action de chocs électrotoniques, sans qu'ils puissent être entachés par une variation de conductance axonique " parasite ".

2 - Potentiels d'inversion des potentiels postsynaptiques.

a - Action du courant sur le PPSE.

Pour des courants hyperpolarisants, le PPSE évoqué par la stimulation sous-liminaire des nerfs XI (fig. 43) grandit d'abord régulièrement, puis son amplitude s'accroît plus rapidement que le potentiel de membrane ,ce qui est conforme à l'augmentation de la résistance membranaire observée pour cette portion de la courbe (relations voltage-courant).

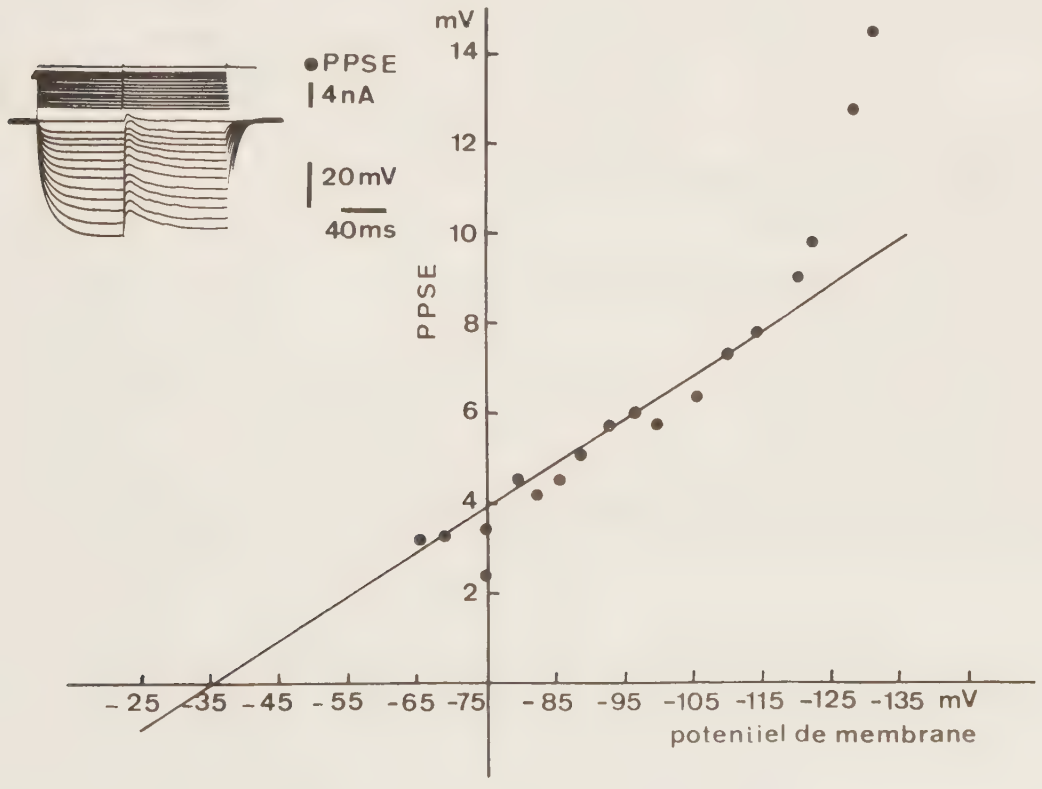


Fig. 43 - Evolution du PPSE monosynaptique évoqué par la stimulation du nerf XI homolatéral, en fonction du potentiel membranaire. Le potentiel d'inversion, obtenu par extrapolation de la portion rectiligne de la courbe, est dans le cas présent, voisin de -35 mV. Le potentiel de repos (-75 mV) a été déterminé après dépolarisation de l'électrode distale, par du KCl= 210 mM.

Sous l'action de courants dépolarisants, il diminue et dans certains cas, il peut presque s'annuler, mais nous n'avons jamais pu l'inverser. Il semble bien que les propriétés rectificatrices de la membrane (rectification retardée) jouent alors un rôle important. L'accroissement de la conductance axonique est telle qu'il limite considérablement la densité de courant au niveau de la membrane subsynaptique . Nous avons vu plus haut que, dans notre préparation, la relation voltage- courant n'est linéaire que sur une faible portion, où elle se comporte comme une simple résistance ohmique. Elle correspond à la portion également rectiligne de la relation " PPSE-potentiel de membrane". Le prolongement de cette portion rectiligne permet, par extrapolation, d'évaluer approximativement le potentiel d'inversion du PPSE. Il se situe à son intersection avec l'axe des abscisses (PPSE = 0). Les valeurs mesurées oscillent entre -35 et -47 mV (données acquises à partir de 6 expériences). Le potentiel de membrane est évalué après dépolarisation de l'électrode distale par du KCl, isotonique au liquide physiologique. Cette mesure n'est pas toujours totalement dépourvue d'erreurs. La dépolarisation peut ne pas être complète.

En conséquence , nos expériences ne permettent pas de mesurer de façon précise le potentiel d'inversion du PPSE et donc de retenir ce critère comme un argument en faveur d'une synapse chimique.

b - Potentiel d'inversion des PPSIs.

Aussi bien le PPSI évoqué par la stimulation des nerfs X (fig. 44) que les PPSIs unitaires " spontanés " (fig. 45) s'inversent pour une valeur voisine du potentiel de membrane (- 80 à - 82 mV). Là encore, la courbe suit approximativement la relation voltage-courant .

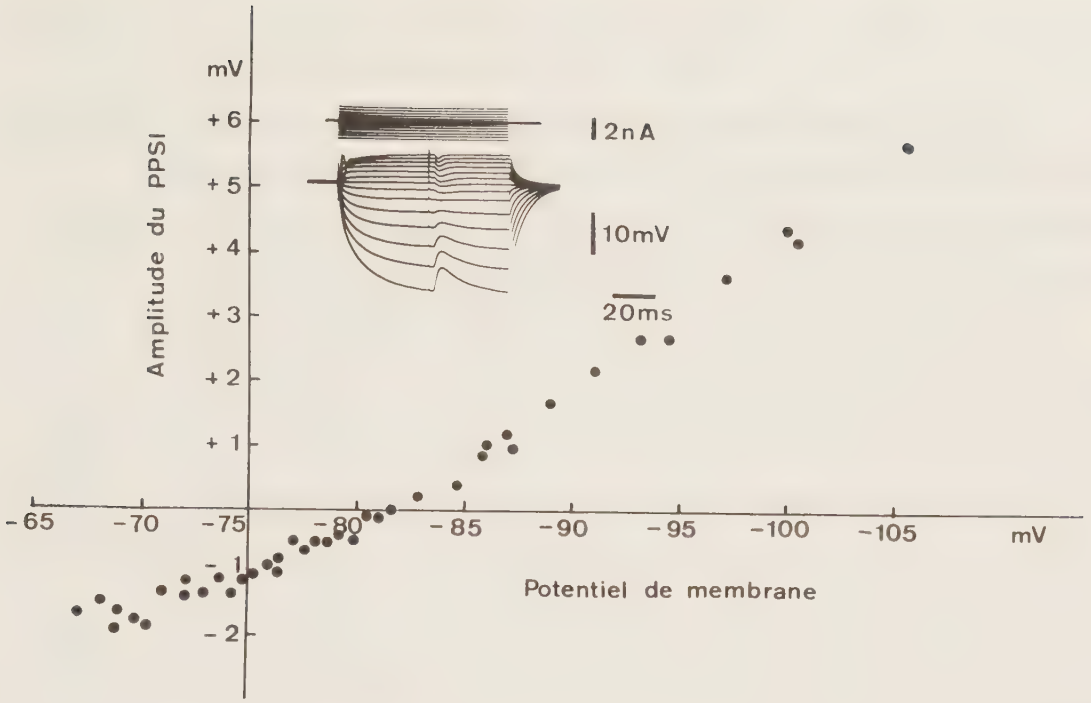


Fig. 44 - Potentiel d'inversion du PPSI évoqué par la stimulation du nerf X homolatéral
Potentiel de repos = -75 mV

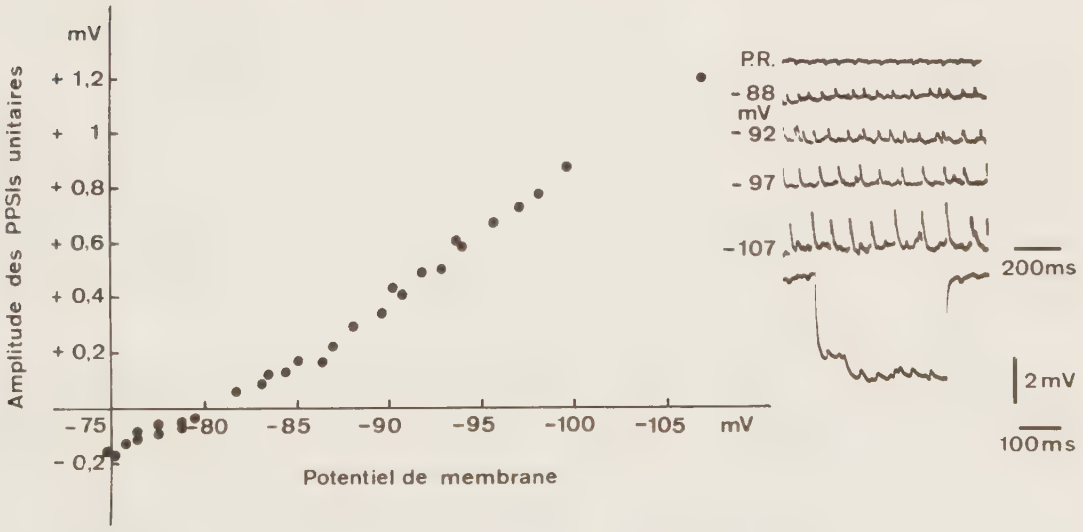


Fig. 45 - Potentiel d'inversion de PPSIs unitaires " spontanés " provenant certainement (d'après le critère de fréquence) de l'activité d'un seul neurone présynaptique. Chaque point de la courbe représente la moyenne d'amplitude d'une trentaine de PPSIs. Sur la droite de la figure sont représentés quelques exemples d'enregistrements obtenus à différents niveaux du potentiel membranaire. P.R. = potentiel de repos = -75 mV. Le tracé du bas montre l'inversion de PPSIs au cours d'un choc électrotonique relativement bref. Ce choc est en grande partie compensé par le pont de Wheatstone afin de ramener le tracé dans le champ de l'oscilloscope.

3 - Discussion

La valeur du potentiel d'inversion du PPSE obtenue par extrapolation est notablement plus négative (-35 à -47 mV) que celles enregistrées sur la plupart des préparations étudiées, où elles s'établissent approximativement entre 0 et -20 mV (voir références par ECCLES, 1964; GINSBORG, 1967).

Chez *Periplaneta americana*, PITMAN et KERKUT (1970) ont, dans des corps cellulaires non identifiés du ganglion A_6, évalué E_{PPSE} à - 45,3 mV $\pm$ 1,9 mV, valeur très voisine des nôtres. Ces auteurs accordent, en plus des ions Na^+, une part importante aux ions K^+ pour la genèse du PPSE. Il est à noter que les PPSEs qu'ils ont enregistrés ont une durée très élevée (2 secondes environ) sans commune mesure avec la durée des PPSEs relatifs aux fibres géantes (10 à 15 ms). Ils sont en effet déclenchés par la stimulation des connectifs antérieurs, ce qui exclut leur appartenance à ce système et doivent vraisemblablement subir une importante déformation due à la conduction électrotonique.

Des expériences réalisées sur la chaîne montrent que, pour les fibres géantes, E_K est voisin de - 110 mV et E_{Na} de +57 mV (PICHON, thèse 1969). Etant donné que E_{PPSE}, dans nos expériences, aurait une valeur fortement négative (voisine de -40 mV), il est concevable d'admettre une participation relativement importante des ions K^+, comme au niveau des corps cellulaires. E_{PPSE} tendrait ainsi plus vers E_K que dans la plupart des autres préparations connues. Il n'est cependant pas exclu que d'autres ions, et notamment Cl^- et Ca^{++} puissent participer à la genèse du PPSE.

L'évaluation de E_{PPSE} à partir d'enregistrements effectués au niveau des corps cellulaires ou à la sortie du ganglion (fibre géante) peut être considérée comme très approchée dans la mesure où, dans les deux cas, les sites synaptiques, générateurs des PPSEs, sont relativement éloignés. Il s'ajoute à la dissipation électrotonique des PPSEs, les propriétés rectificatrices de la surface de membrane comprise entre le corps cellulaire ou la sortie du ganglion, et la zone synaptique. La densité de courant affectant réellement cette région ne peut être qu'une fraction du courant appliqué.

Des mesures plus précises de E_{PPSE} pourraient être faites en plaçant une microélectrode en position intracellulaire, dans le neuropile, aussi près que possible de la zone synaptique. A cela s'ajoutent cependant, de très

grandes difficultés d'identification de la fibre interrogée. Nous avons préféré réaliser quelques expériences incomplètes mais rester dans le cadre d'une monographie établie autour d'une seule fibre géante parfaitement identifiée.

Dans nos expériences, il est aisé d'inverser les PPSIs évoqués et " spontanés " . Dans les deux cas, le potentiel d'inversion a la même valeur (voisine de - 80 mV). Ces faits renforcent considérablement l'idée d'une variation de perméabilité aux mêmes ions pour les deux types de potentiels. Ces valeurs, proches du potentiel de repos (ce qui explique l'absence de difficultés pour obtenir l'inversion), sont voisines de celles rencontrées chez de nombreux animaux, où elles oscillent entre une légère dépolarisation et une hyperpolarisation qui peut atteindre 25 mV (voir revue par GINSBORG, 1967). Les ions généralement impliqués sont le Cl^- ou le K^+.

PITMAN et KERKUT (1970) ont également enregistré des PPSIs au niveau du ganglion A_6, toujours dans des corps cellulaires non identifiés, par stimulation du " nerf génital " (nerf phallique ?). Ces PPSIs ont une très longue durée (entre 0,5 et 2 secondes) et leur potentiel d'inversion est égal à - 78,9 mV $\pm$ 2,1 mV. Ces auteurs ont montré une certaine participation des ions K^+, ajoutée à celle des ions Cl^-.

Compte-tenu de ces divers résultats,nous pouvons admettre que, au niveau du système de fibres géantes, la genèse des PPSIs nécessite l'intervention des ions Cl^-, et à un moindre degré, des ions K^+. Par ailleurs, les PPSEs pourraient correspondre à une augmentation de la conductance aux ions Na^+ associée à une participation relativement importante d'autres ions (K^+ par exemple).

Pour certains auteurs, l'inversion des potentiels postsynaptiques constitue un bon critère en faveur d'une synapse chimique (WERMAN, 1966; GERSCHENFELD, 1966). Nos expériences appuient fortement l'hypothèse d'une transmission de type chimique pour toutes les influences inhibitrices . L'impossibilité d'inverser le PPSE laisse en suspens le problème de la nature chimique ou électrique des influences excitatrices. Nous savons en effet que dans le cas de synapses électriques, le PPSE peut varier en amplitude sous l'action de courants électrotoniques, mais qu'il ne peut pas s'inverser (BENNETT, 1968). Par contre, nous pouvons peut-être retenir le critère du délai synaptique qui, chez la Blatte, ne paraît pas pouvoir être inférieur, après correction, à 0,7 ms environ. Or, à la plupart des synapses électriques connues,

le délai synaptique est fréquemment inférieur à 0,1 ms (BENNETT, NAKAJIMA et PAPPAS, 1967; BENNETT, 1968). Ces quelques réserves mises à part, nous pensons cependant qu'il est peu probable que les afférences excitatrices ne soient pas liées à l'intervention d'un médiateur chimique. Nous tenterons plus loin de répondre plus précisément à cette question en cherchant à déterminer l'identité du ou des médiateurs impliqués.

D - INTERACTIONS ENTRE PPSE ET PPSI.

Pour cette étude nous avons stimulé simultanément les nerfs cercaux X et XI homolatéraux (fig. 46). En faisant varier le délai entre les deux phénomènes ainsi obtenus (PPSE et PPSI),il est possible d'observer l'évolution de chacun d'eux et de dégager leurs effets réciproques. La superposition des deux types de potentiels montre clairement une inhibition importante.

L'analyse précise de la variation d'amplitude du PPSE et du PPSI en fonction du délai qui les sépare permet de dégager plusieurs aspects.

Le PPSE diminue brusquement d'amplitude environ 3 ms (1) avant le début du PPSI (fig. 47). Il s'annule pratiquement pendant la première milliseconde puis augmente à nouveau rapidement (il récupère approximativement 70 % de son amplitude au sommet du PPSI). Pendant le temps de descente du PPSI, la récupération se fait plus lentement et il retrouve son amplitude initiale au bout de 25 à 30 ms.

Fig. 46 - Interaction entre PPSE et PPSI. Le délai entre les deux potentiels varie progressivement, ce qui entraîne une inhibition importante lorsque les deux potentiels sont juxtaposés (photos n° 7 et 8). Noter l'accroissement du PPSI lorsqu'il se greffe sur la phase descendante du PPSE (photos n° 10 et 11) et la présence occasionnelle d'un PPSE retardé (photos n° 9, 10 et 11).

(1) Le procédé de mesure utilisé peut introduire un facteur d'erreur. Compte-tenu de l'épaisseur du trait (grandissement utilisé = 13), il est difficile de déterminer avec précision le point de départ des deux potentiels postsynaptiques et donc de donner une valeur absolue à cette mesure.

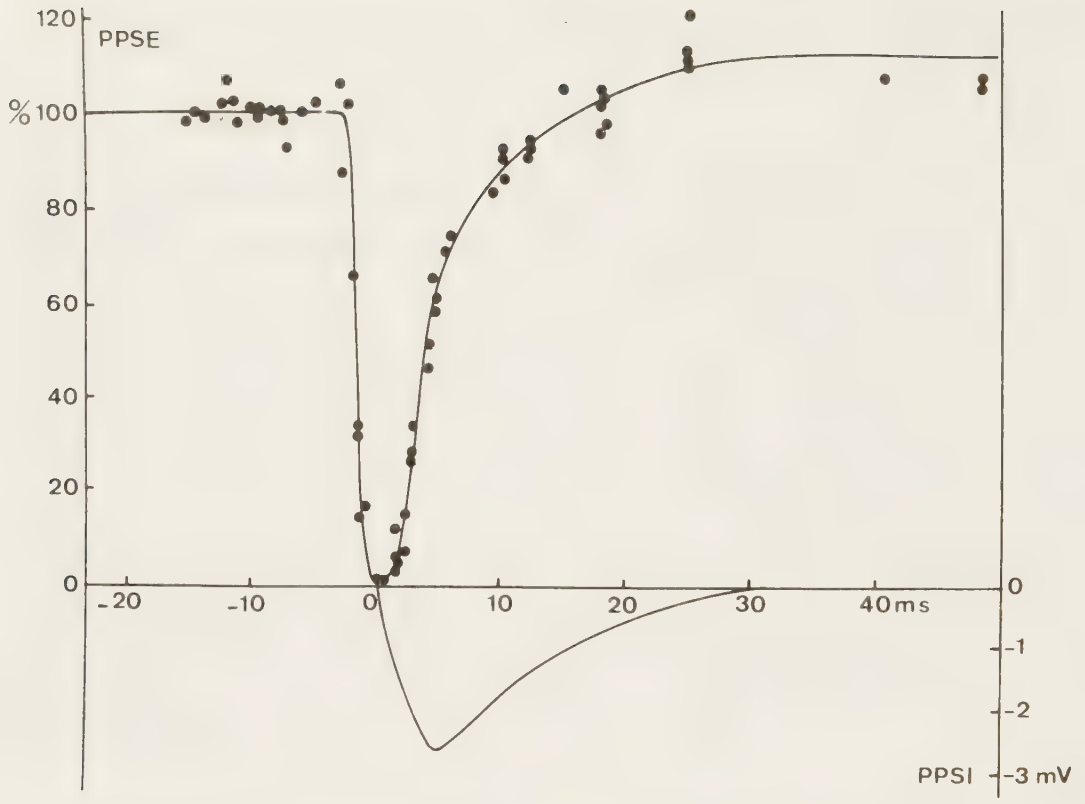


Fig. 47 - Evolution de l'amplitude du PPSE (en " pour cent " de l'amplitude initiale) au cours de son interaction avec le PPSI. En abcisse, temps qui sépare le point de départ du PPSE de celui du PPSI (temps zéro).

Le PPSI subit également d'importantes variations qu'illustre la fig. 48. Il commence également à diminuer d'amplitude environ 3 ms avant le début du PPSE et passe par un minimum (correspondant à 40 % de sa valeur de départ) approximativement lorsque le délai entre les deux potentiels est nul. Pendant le temps de montée du PPSE, il s'accroît rapidement et passe par un maximum (environ 350 % de sa valeur initiale) au sommet du PPSE. Il diminue ensuite suivant une courbe exponentielle dont la constante de temps se calque approximativement sur celle du PPSE.

La réduction d'amplitude des deux phénomènes peut s'expliquer par le changement de conductance produit par l'action respective des médiateurs excitateur et inhibiteur (nous ne savons pas encore s'il s'agit du même ou de deux médiateurs différents). Il est remarquable de noter que, dans les deux cas, la réduction maximum se situe au début du temps de montée ce qui nous permet de penser que l'action du médiateur se manifeste principalement

pendant cette période. Ces faits confirment des résultats comparables trouvés dans bien d'autres préparations, en particulier dans le motoneurone de Chat (CURTIS et ECCLES, 1959) et à la synapse neuromusculaire de la Grenouille (FATT et KATZ, 1951) ou d'Insectes (USHERWOOD et GRUNDFEST, 1965; PEARSON et BERGMAN, 1969).

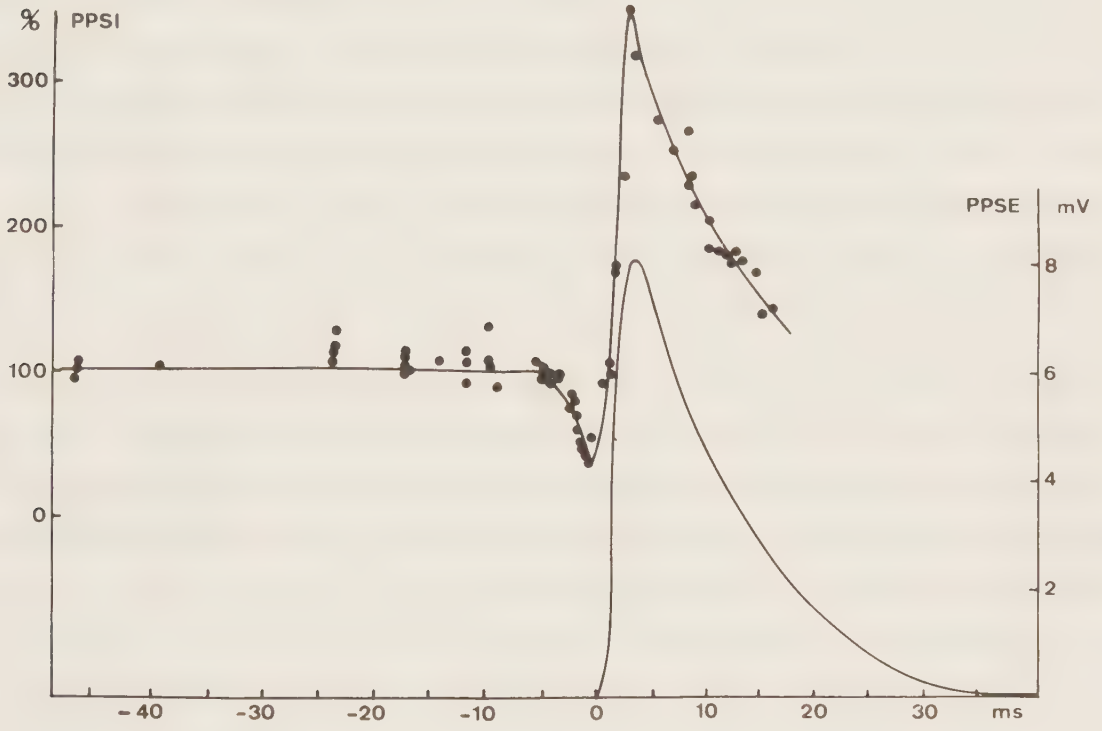


Fig. 48 - Evolution de l'amplitude du PPSI (en " pour cent " de l'amplitude initiale) au cours de son interaction avec le PPSE. En abscisse, temps qui sépare le point de départ du PPSI de celui du PPSE (temps zéro).

Y a-t-il cependant une différence dans la durée d'action du médiateur au cours des deux types de potentiels. (1)

Le PPSI augmente de manière importante dès le sommet du PPSE ce qui s'explique par les effets de la dépolarisation (revoir la fig. 44) qui tend à

(1) Nous avons essayé d'évaluer les variations de conductance postsynaptique pendant la durée d'action d'un PPSI ou d'un PPSE à l'aide d'un pont alternatif, malheureusement sans résultats probants. Les difficultés résident dans la durée relativement brève de ces deux potentiels, ce qui nécessite l'emploi de fréquences élevées, fréquences pour lesquelles il est alors difficile de compenser la variation d'amplitude par le montage en pont de Wheatstone utilisé.

éloigner le PPSI de son potentiel d'inversion. En outre, ce comportement semble indiquer que la phase active de la transmission (variation de conductance) est pratiquement achevée dès le sommet du PPSE et qu'elle se situe par conséquent dans une large mesure pendant le temps de montée du PPSE.

Si on applique le même raisonnement pour expliquer les variations du PPSE pendant le décours temporel du PPSI, on doit s'attendre à ce qu'il conserve pratiquement son amplitude initiale ou même qu'il subisse une légère potentiation due à l'hyperpolarisation qui l'éloigne de son potentiel d'inversion (revoir la fig. 43). Nous observons au contraire une diminution du PPSE s'étalant sur la durée totale du PPSI. Cette observation cadre avec le fait que la variation de conductance, maximum au début, se maintient, tout en diminuant progressivement pendant tout la durée du PPSI.

En résumé, la variation de conductance à l'origine du PPSE serait relativement brève et virtuellement terminée au bout de 3 ms environ. Le PPSI par contre serait lié à une variation de conductance maximum au début, mais se prolongeant pendant toute sa durée, soit 25 à 30 ms. On peut supposer que les sites récepteurs de la membrane postsynaptique ont des réactions cinétiques différentes sous l'action du ou des médiateurs.

Il est à noter que ces interactions PPSE - PPSI , qui sont très importantes si on met en jeu la plupart des afférences par la stimulation sub-maximale des nerfs X et XI (fig. 46), sont parfois beaucoup moins visibles, sinon nulles, si l'on s'adresse à des PPSEs et des PPSIs unitaires ou si très peu d'afférences sont sollicitées. Ce phénomène apparaît nettement sur la fig. 27 où des PPSEs unitaires ne subissent que peu d'effets alors qu'ils se greffent pendant le temps de montée du PPSI (exemples marqués d'une flèche). Dans ce cas les zones subsynaptiques intéressées sont vraisemblablement localisées en des endroits différents, et seraient suffisamment éloignées l'une de l'autre, pour ne pas pouvoir subir de façon sensible les effets dus à leurs courants ioniques respectifs.

Ces différents faits constituent un argument en faveur d'une répartition en mosaïque relativement homogène des sites récepteurs excitateurs et inhibiteurs sur l'ensemble de " l'arbre dendritique ". Il n'est cependant pas exclu qu'une part d'inhibition soit liée à un effet présynaptique .

E - CONCLUSION PARTIELLE.

A l'issue de ce chapitre sur l'analyse électrophysiologique des potentiels postsynaptiques, nous pouvons dire que chacune des fibres géantes médio-ventrales (fibres II) est l'objet de très nombreuses influences transmises par des afférences excitatrices (essentiellement par les nerfs XI) et inhibitrices (essentiellement par les nerfs X) provenant des deux cerques.

Toutes les influences excitatrices sont liées à l'activité de mécano-récepteurs cercaux. Chaque fibre cercale excitatrice établirait plusieurs contacts monosynaptiques dispersés sur l'arbre dendritique de la fibre géante.

Une grande part des influences inhibitrices provient également de l'activité de certains récepteurs cercaux ou paracercaux, dont nous ne connaissons pas la localisation précise. Ces récepteurs sont d'une extrême sensibilité, ce qui permet de les différencier des récepteurs excitateurs. Ces influences inhibitrices parviendraient à la fibre géante par un relais disynaptique; les interneurones inhibiteurs sont inclus dans le même ganglion et seraient en nombre limité. Il n'est pas impossible d'envisager le repérage de leurs corps cellulaires, par l'utilisation simultanée de microélectrodes.

Les PPSEs et PPSIs constituent les témoins respectifs de ces deux catégories d'influences. Ces témoins sont enregistrés à distance et ne donnent qu'une idée approximative des phénomènes les plus fins qui succèdent à l'arrivée du potentiel d'action dans les terminaisons présynaptiques et de leurs mécanismes d'action.

L'étude de leurs potentiels d'inversion autorise à affirmer que les PPSIs (E_{PPSI} = - 80 mV) nécessitent l'intervention d'une substance médiatrice ou transmetteur chimique. Libérée par les terminaisons présynaptiques des interneurones inhibiteurs, elle réagirait avec certains récepteurs de la membrane postsynaptique, ce qui entraînerait l'ouverture de " pores " favorisant le passage d'ions (vraisemblablement ions Cl^- ou K^+, mais ceci mériterait une étude approfondie particulière). L'effet inhibiteur est évident car

l'ouverture de ces pores tend à éloigner le potentiel de membrane du seuil critique amenant le déclenchement des influx propagés. Nous avons pu le mettre particulièrement en relief lors d'expériences d'interactions entre PPSI et PPSE.

Nous n'avons pas réussi à inverser les PPSEs, ce qui ne nous permet pas d'asseoir définitivement l'hypothèse d'une médiation chimique; cependant plusieurs éléments militent en faveur d'une telle hypothèse:

- leur forme rappelle beaucoup celle de PPSEs obtenus dans de nombreuses autres préparations et se différencie très nettement de potentiels d'action parcourant la même fibre ou des fibres voisines et transmis électrotoniquement jusqu'au site d'enregistrement;

- ils sont précédés d'un petit potentiel, parfois même visible devant les PPSEs unitaires, et qui peut correspondre à l'influence électrotonique du potentiel d'action présynaptique;

- un délai minimum de 0,7 ms sépare ce potentiel cercal électrotonique du PPSE. Il peut être considéré comme le délai synaptique nécessaire aux processus intermédiaires pour se développer et se manifester;

- des expériences comportant des interactions entre PPSE et PPSI soulignent que l'efficacité des deux potentiels est différente. Celle des PPSEs en particulier ne durerait que pendant le temps de montée. Nous avons admis que cet effet est compatible avec l'intervention d'un médiateur dont l'action dans le temps serait limitée. De plus, ces différences dans les variations de la conductance membranaire (3 ms pour le PPSE, 25 à 30 ms pour le PPSI) nous ont amené à formuler l'hypothèse selon laquelle les afférences excitatrices et inhibitrices libéreraient des médiateurs différents. Nous tenterons de répondre à cette question dans le chapitre IV.

Les PPSEs unitaires ont une amplitude moyenne de 0,5 mV (nous raisonnons toujours dans nos conditions spéciales d'enregistrement), alors que le seuil de déclenchement de l'influx propagé est en moyenne de 6 mV. Le rapport entre ces deux valeurs (0,5 à 6 mV) met bien en relief la nécessité d'une stimulation massive et relativement synchrone des mécanorécepteurs pour atteindre le seuil. En d'autres termes, la fibre géante est protégée par un facteur de sécurité important qui la met à l'abri des stimulations faibles.

On pourrait dire que ce qui importe pour l'animal est qu'il soit informé seulement des stimulations les plus fortes, celles qui sont suffisantes pour amener le potentiel de membrane jusqu'au seuil. Ce facteur est renforcé par l'existence d'une inhibition qui apparaît comme très puissante et issue d'un territoire réceptif différent. Il se pose encore plusieurs questions, auxquelles nous tenterons aussi de répondre à la fin de ce mémoire: notamment quelle peut être la signification de cette inhibition massive d'une part et des innombrables influences sous-liminaires (PPSEs et PPSIs unitaires) d'autre part, pour l'animal vivant ?

Cet ensemble relativement simplifié nous paraît intéressant à plus d'un titre (1).

- L'élément postsynaptique est parfaitement identifiable et contrôlable, ce qui autorise la reproductibilité des expériences et ce faisant, leur comparaison dans les meilleures conditions. Ainsi, on peut contrôler à tout instant les variations du potentiel membranaire aussi bien lentes que rapides (à condition toutefois que leur origine ne soit pas trop éloignée du site d'enregistrement et qu'elles puissent sortir du bruit de fond) et les variations de conductance membranaire (avec cette restriction que la localisation très précise de ces variations est délicate).

- Les éléments présynaptiques excitateurs peuvent être également identifiés et contrôlés , de manière unitaire, soit sur le nerf afférent, soit au niveau même des mécanorécepteurs cercaux. Les " récepteurs inhibiteurs " ne sont malheureusement pas localisés mais peuvent être stimulés sans doute aussi de manière unitaire.

L'association de ces diverses possibilités de contrôle permet d'envisager de faire de cette synapse intégratrice un modèle. Pour cela il est nécessaire de mieux connaître encore le système " fibres cercales- fibres géantes "

(1) En plus de ce système simplifié, nous avons signalé tout un ensemble de phénomènes qui, compte-tenu de leur délai et de leur extrême labilité (réponses retardées), sont vraisemblablement liés à un réseau multineuronique extrêmement complexe.

et de chercher à répondre à plusieurs questions :

1° - Comment s'établit la sommation des éléments de base que sont les PPSEs et les PPSIs unitaires ? Est-elle purement passive, autrement dit se fait-elle uniquement en fonction des caractéristiques électriques membranaires postsynaptiques, ou bien est-elle l'objet de modifications au cours même de la sommation ? Afin d'apporter certains éléments de réponse à cette question, nous étudierons les effets de la répétition des stimulations aussi bien sur une seule afférence (effets au cours d'un seul message sensoriel) que sur un plus grand nombre (Chapitre II).

2° - Nous verrons également que plusieurs facteurs jouent un rôle important aussi bien aux niveaux pré- que postsynaptiques, et notamment certains gaz (oxygène et gaz carbonique) et certains ions (Ca^{++} et Mg^{++}) (Chapitre III).

3° - Une autre question fondamentale se pose enfin : quel est le ou les transmetteurs chimiques libérés par les afférences excitatrices et inhibitrices ? (Chapitre IV).

Chapitre II

stimulation répétitive des récepteurs et des afférences cercales : étude de quelques facteurs pouvant affecter l'efficacité de la transmission synaptique.

Dans les conditions normales, naturelles, les synapses sont activées par des salves de potentiels d'action empruntant une ou plusieurs afférences et atteignant souvent des fréquences élevées. Dans le cas présent, ces potentiels proviennent en grande partie de récepteurs cercaux qui, selon leur nature et le mode de stimulation qu'on leur applique, émettent des messages sensoriels dont les caractéristiques peuvent varier considérablement, essentiellement en fréquence.

L'identification possible de la fibre géante disséquée et des récepteurs cercaux en relation monosynaptique avec elle nous paraissent des éléments importants permettant d'étudier le comportement synaptique sous l'action de différents messages provenant de la stimulation répétitive présynaptique.

Un essai d'étude synthétique nous a permis de constater que, d'après la littérature, les auteurs ont essentiellement utilisé trois méthodes pour étudier les variations d'amplitude des potentiels postsynaptiques (PPSs) au cours de stimulations afférentes répétitives appliquées sur une même voie ou sur des voies différentes :

- par enregistrement des PPSs correspondant à une paire de stimuli appliqués à des intervalles variés;
- par enregistrement et mesure des PPSs succédant à des volées stimulantes de fréquences variées. Dans ce cas la stimulation peut être appliquée électriquement sur les afférences ou résulter d'une stimulation naturelle plus ou moins globale d'un champ sensoriel donné;
- par contrôle sur un PPS-test succédant à intervalles variables à une salve conditionnante dont le nombre et la fréquence des stimuli est également variable (facilitation ou dépression post-tétanique).

Nous avons utilisé essentiellement les deux premières méthodes, tout en insistant particulièrement sur l'étude de messages unitaires, obtenus dans des conditions aussi proches que possible des conditions naturelles.

Après une étude rapide des différents types de messages émis par les mécanorécepteurs en relation avec la fibre II, nous verrons comment cette dernière se comporte sous l'action de différents messages sensoriels unitaires. Nous complèterons ces résultats d'abord par la stimulation électrique (artificielle) d'une seule fibre cercale (stimulation effectuée au niveau même d'un récepteur) ou d'un ensemble d'afférences (stimulation électrique des nerfs XI ou X). Cette étude nous permettra de mettre en relief l'importance de certains facteurs (facilitation, dépression, habituation synaptiques) dans l'efficacité de la transmission.

A - DIFFERENTES CATEGORIES DE MESSAGES SENSORIELS EXCITATEURS(1)

Bien qu'une carte complète de tous les mécanorécepteurs en relation homo-ou contralatérale avec une fibre géante donnée n'ait pas été établie, il a pu être démontré que le nombre de ces récepteurs est élevé . Les messages émis par ces récepteurs peuvent être classés essentiellement en deux catégories se superposant à certaines différences morphologiques .

1 - Messages de type phasico-tonique .

Ces messages se caractérisent par des trains d'influx de longue durée et de fréquence relativement stable, souvent basse. Ils sont associés à des soies longues, fines et flexibles.

Aux soies les plus longues (700 µm), correspondent des messages présentant une composante phasique brève (dont la fréquence peut atteindre 370 par seconde) suivie d'une composante tonique qui peut se maintenir tout le temps que la soie se trouve fixée dans le plan préférentiel de fonctionnement (fig. 50, tracés supérieurs). Ces récepteurs ont par conséquent une nette prédominance tonique et donnent des messages qui seront toujours qualifiés de " toniques ". Ils sont extrêmement sensibles aux mouvements d'air. C'est ainsi que, selon NICKLAUSS (1965), leurs réponses atteignent 40 % de leur maximum lorsque la soie décrit seulement un arc de 2 degrés dans le plan préférentiel de fonctionnement. Si ces récepteurs sont très sensibles, ils cessent cependant vite de répondre lorsque la flexion qui leur est imposée augmente trop.

D'autres soies fines, plus courtes (moins de 350 µm) sont moins sensibles que les précédentes aux mouvements d'air et ont un temps d'adaptation au stimulus mécanique plus ou moins long. Autrement dit, leur composante tonique est relativement brève. Les messages émis par ces récepteurs seront qualifiés de " phasico-toniques " (fig. 49, tracés inférieurs).

(1) Nous avons dû nous limiter à l'étude des messages en provenance de mécanorécepteurs excitateurs. Nous n'avons pas connaissance, en effet, de la localisation précise des récepteurs " inhibiteurs ".

Il n'existe donc pas de récepteurs purement toniques, mais l'importance de leur composante tonique permet de les différencier aisément des récepteurs " phasico-toniques ". Cela nous permettra d'étudier séparément l'influence des deux principales catégories de messages qu'ils peuvent émettre.

2 - Messages de type phasique.

Ces réponses se caractérisent par des volées d'influx à haute fréquence (pouvant atteindre 360 par seconde) mais de brève durée (fig. 51, tracés inférieurs). Le nombre d'influx est le plus couramment de 3 à 5 par salve, mais peut atteindre une douzaine. Les mécanorécepteurs qui induisent ce type de réponse ont une soie nettement plus courte que celle des toniques, bien qu'elle reste relativement fine. Ils sont situés en bordure du cerque (1). Ils sont sensibles surtout à la vitesse du déplacement de la soie et l'angle de courbure nécessaire à leur activation est plus grand que pour les autres catégories de récepteurs.

Cette brève étude permet de constater que nous avons classé les divers messages en trois catégories : phasico-tonique, " tonique " et phasique. Cette classification reste cependant relativement arbitraire car la première catégorie recouvre tout un ensemble de réponses intermédiaires entre le message purement phasique et celui présentant une composante " tonique " de très longue durée. Selon ces critères, nous allons maintenant étudier successivement quelle est l'influence de ces trois catégories de messages au niveau synaptique et tenter de dégager la part respective de tous les paramètres qui les caractérisent.

(1) De nombreux récepteurs, reconnus comme étant de type phasique, sont distribués sur l'ensemble du cerque. Ils se distinguent des premiers par leur couleur brune et leur aspect plus trapu. Nous n'avons pas pu démontrer leur relation possible avec les fibres géantes.

B - STIMULATION REPETITIVE D'UNE SEULE AFFERENCE.

1 - Stimulation naturelle de différentes catégories de mécanorécepteurs.

Afin d'étudier les effets de messages aussi unitaires que possible, il est important d'isoler le ganglion de toute activité afférente " spontanée " par la mise au repos de tous les récepteurs. Cette opération est possible par un nettoyage et un assèchement complet des cerques (voir techniques).

a - Réponses à un message de type phasico-tonique (fig.49).

Le décours de la réponse postsynaptique correspond à la sommation temporelle des PPSEs unitaires, chacun d'eux étant dû à un potentiel d'action de la volée afférente. Elle se traduit par une dépolarisation qui suit approximativement les changements de fréquence et dont le niveau s'accroît lorsque la fréquence augmente. Ceci est particulièrement net sur la fig. 49, pour les exemples marqués d'un astérisque, où l'on peut observer que des augmentations brutales de fréquence se traduisent par de brusques accroissements de la dépolarisation. Lorsque la fréquence reste pratiquement constante (exemple D de la fig. 49, encadré par 2 flèches) on observe un phénomène de sommation temporelle qui passe par un niveau maximum. On note également que l'amplitude des PPSEs unitaires décroît lorsque la dépolarisation augmente ce qui constitue un facteur limitant.

Ce facteur peut être, soit une certaine " fatigue " liée à une diminution de la quantité de médiateur disponible dans les terminaisons de la fibre cercale, soit le niveau de dépolarisation lui-même qui joue dans le même sens, l'amplitude des PPSEs diminuant au fur et à mesure que s'accentue la dépolarisation (voir fig. 43). Dans ces conditions, le niveau maximum de dépolarisation qui peut être atteint par la stimulation naturelle de ces récepteurs (approximativement 4 mV) n'est pas suffisant pour déclencher un potentiel d'action postsynaptique. Cependant, la fréquence présynaptique atteint au maximum 300 par seconde dans cet exemple, ce qui correspond presque à la fréquence de fonctionnement limite d'un récepteur de ce type.

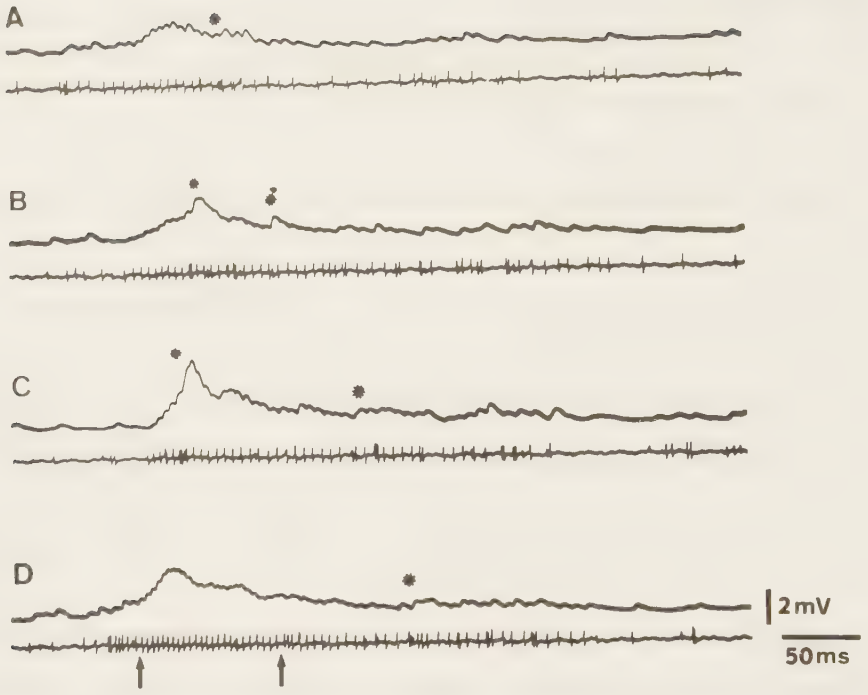


Fig. 49 - Activité postsynaptique (tracés du haut) succédant à la stimulation mécanique d'un mécanorécepteur phasico-tonique. Le décours temporel de la dépolarisation due à la sommation des PPSEs unitaires suit approximativement les variations en fréquence du récepteur. Cela est particulièrement net aux exemples marqués d'un astérisque. En D, une fréquence sensiblement constante (marquée entre deux flèches) montre un exemple typique de sommation. La dépolarisation résultante est cependant limitée par la diminution d'amplitude des PPSEs unitaires.
Noter sur les tracés du bas quelques rares potentiels d'action plus petits qui ne proviennent pas du même récepteur.

b - Réponses à un message de type " tonique " (fig. 50).

La réponse postsynaptique succédant à un tel message débute toujours par une dépolarisation rapide suivie par une repolarisation progressive, même si la fréquence reste constante ou même si elle augmente à nouveau. Ces traits sont particulièrement évidents sur la fig. 50 B, où la séquence ne présente pas de composante initiale phasique particulièrement nette, et où, à l'endroit marqué d'une flèche, une nette augmentation de fréquence de la volée afférente ne provoque pas de dépolarisation notable, alors qu'au début de la séquence, une fréquence plus faible entraîne une dépolarisation bien plus importante.

De tels messages élaborés dans des conditions de stimulation sub-naturelles ne favorisent pas une étude statistique quantitative de l'évolution des PPSEs unitaires au cours d'une séquence dont la fréquence est variable. On peut cependant, à partir de l'exemple évoqué ci-après , dégager qualitativement la présence de certains phénomènes. L'analyse de l'amplitude relative

et de la fréquence des quatre premiers PPSEs unitaires de six séquences différentes (dont trois d'entre elles illustrent la fig. 50) sont rassemblées dans le tableau VI .

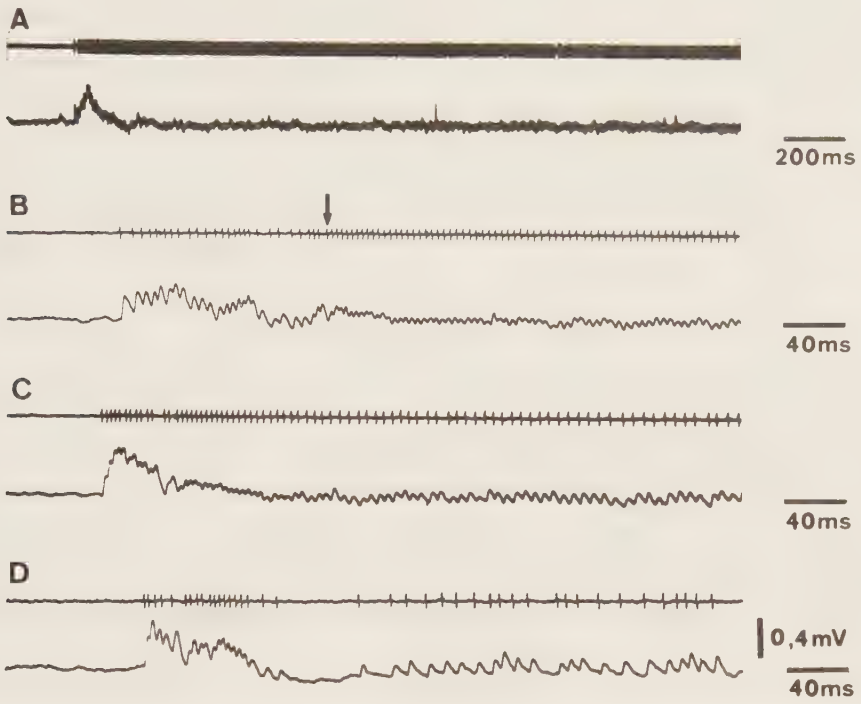


Fig. 50 - Réponses postsynaptiques (tracés du bas) succédant à la stimulation mécanique d'un mécanorécepteur " tonique ". Le même récepteur est à l'origine des quatre séquences (A-D). On peut observer un phénomène de sommation qui peut se décomposer en une dépolarisation initiale suivie par une repolarisation relativement rapide. Cet effet est particulièrement net dans la séquence B où une augmentation de la fréquence (marquée d'une flèche) est incapable d'accroître, de manière significative, la dépolarisation.
En D, une interruption en début de séquence dévoile une composante hyperpolarisante. Elle existe dans les trois autres enregistrements, mais est moins visible.

On peut observer que pour des fréquences comprises entre 123 et 370 par seconde, le second PPSE ne subit pas de perte d'amplitude, et présente dans certains cas une légère facilitation (1). Il en est encore de même pour le troisième PPSE par rapport au second. Par contre,dès le quatrième PPSE, la perte d'amplitude est nette et l'examen de la fig. 50 montre clairement qu'elle s'accentue ensuite très rapidement et qu'elle se maintient bientôt à un valeur moyenne stable tout au long de la composante " tonique ".

(1) Lorsque deux PPSEs se chevauchent, l'amplitude du second PPSE est évaluée après extrapolation du premier par une ligne pointillée (voir fig.52).

Tableau VI

Séquences n°	A_1	A_2/A_1	F_1	A_3/A_1	F_2	A_4/A_1	F_3	F_{max}
1	160 µV	112%	123	120%	208	98%	256	303
2	280 µV	106%	303	111%	370	71%	370	370
3	275 µV	98%	350	98%	300	78%	255	350
4	410 µV	74%	215	75%	290			350
5	340 µV	115%	123	82%	175	88%	185	333
6	400 µV	110%	370	90%	222	73%	238	370

A_1, A_2, A_3, A_4 : amplitudes respectives des quatre premiers PPSEs unitaires de chaque séquence.
F_1: fréquence instantanée correspondant à l'intervalle entre les PPSEs n° 1 et 2.
Fmax : fréquence instantanée maximum observée au cours de la séquence.

Ainsi, après une brève phase initiale où l'on peut même observer une légère facilitation, des effets dépresseurs extrêmement importants se développent (mise en jeu d'un circuit inhibiteur de longue durée ou déplétion de la quantité de médiateur disponible) et se maintiennent pendant toute la séquence. Un arrêt de quelques minutes est nécessaire afin de permettre une restauration totale.

Il est à remarquer que les PPSEs unitaires de faible amplitude de la composante " tonique " ne sont pas sans rappeler l'activité de base décrite précédemment (fig.20 A), lorsque la préparation vient d'être mise en place. Il est vraisemblable que dans ce cas la majorité des récepteurs mis en activité sont de type " tonique " (ce sont en effet les récepteurs les plus sensibles) et qu'il se produit la même chose chez l'animal vivant. Nous pouvons supposer que cette activité peut constituer une sorte de tonus de base permanent qui pourrait entretenir un certain niveau d'excitabilité.

Si la stimulation est momentanément arrêtée à la fin de la composante phasique dépolarisante (fig. 50 D),on peut observer une faible et lente hyperpolarisation. Elle est également présente sur les trois autres enregistrements où elle est en partie masquée par l'activité de base. Il est possible que cette composante hyperpolarisante soit liée à un mécanisme d'inhibition de longue durée qui pourrait être mis secondairement en jeu au début de la composante phasique. Elle expliquerait le phénomène de dépression très important qui se développe alors et qui minimiserait les effets dépolarisants de la composante phasique.

De telles hyperpolarisations ont souvent été observées, à la suite d'une période de stimulation répétitive, sur des fibres nerveuses, (RITCHIE et STRAUB, 1957; CONNELLY, 1962; HOLMES, 1962; RANG et RITCHIE, 1968), ou au niveau du SNC (voir par exemple KEHOE et ASCHER, 1970, dans le cas d'un PPSI retardé). Ces hyperpolarisations post-tétaniques sont souvent abolies par l'ouabaïne et des inhibiteurs métaboliques. On pense donc généralement que la salve tétanisante met en jeu, une pompe au sodium-potassium (1). Il n'est pas impossible qu'un tel mécanisme puisse être invoqué pour expliquer les observations faites chez la Blatte au cours de la stimulation d'un seul récepteur ou même à la suite de stimulations mécaniques massives (voir fig. 33).

c - Réponses à un message de type phasique (fig. 51).

La stimulation mécanique des récepteurs à l'origine de ce type de message donne de brèves volées comprenant un à douze potentiels d'action. La densité de chaque bouffée ne dépend pas de la durée de la stimulation mais essentiellement de l'angle de courbure imprimé au poil et de la vitesse de déplacement. Ces paramètres rendent difficile une stimulation mécanique parfaitement constante ce qui explique l'obtention de bouffées irrégulières (fig. 51 C et D). La fréquence à l'intérieur de chaque séquence est relativement élevée (entre 180 et 300 /s). Comme pour les autres types de messages, cette fréquence est suffisamment élevée pour permettre la sommation temporelle. Elle est accompagnée par un phénomène de facilitation nettement visible à l'intérieur de chaque salve (voir en particulier les exemples A et B de la fig. 51). Le second PPSE est souvent plus ample que le premier ainsi

(1) De telles hyperpolarisations peuvent être aussi le résultat d'une augmentation de la perméabilité potassique (KEHOE et ASCHER, 1970).

que le troisième par rapport au second. En outre, on peut déceler un phénomène de " fatigue " très accentué lorsque la fibre géante est soumise à la répétition des volées, l'amplitude du premier PPSE de chacune d'elles étant de plus en plus petite.

La facilitation ou potentiation est mise en évidence par la fig. 52 . L'amplitude du second PPSE est exprimé en " pour cent " du premier en fonction de l'intervalle de temps qui les sépare. Quand cet intervalle est compris entre 3 et 8 ms, nous observons un accroissement du second PPSE qui peut atteindre plus de 20 %.

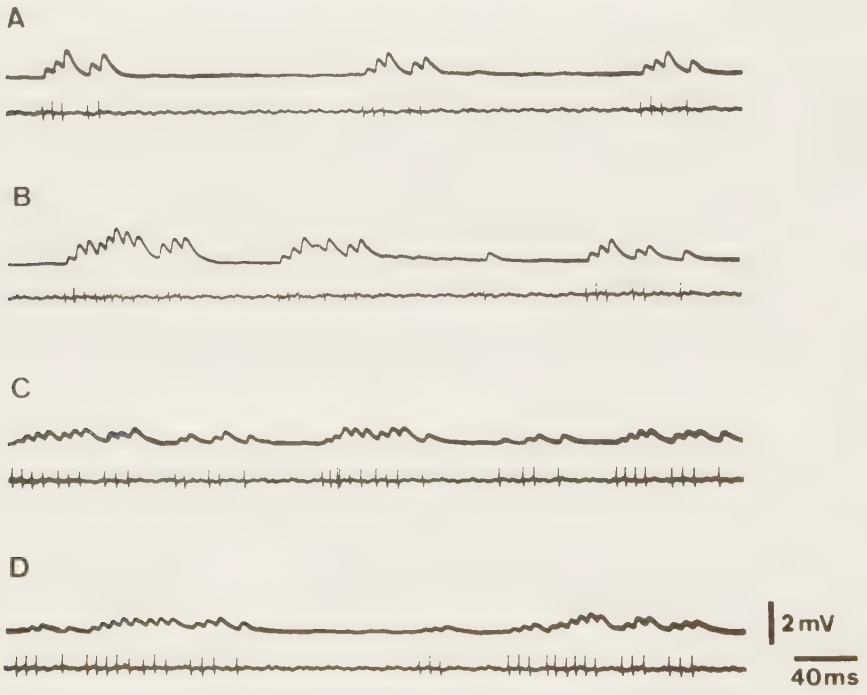


Fig. 51 - Quelques exemples de réponses postsynaptiques (tracés du haut) succédant à la stimulation mécanique d'un mécanorécepteur phasique, par de brefs mouvements répétés. A - D sont sélectionnés, à intervalles approximativement réguliers, au cours d'une séquence totale de 12 secondes (voir fig. 53). Noter que la facilitation est visible dans chaque volée, tandis que la " fatigue ", qui s'installe progressivement affecte l'amplitude de chaque PPSE. L'activité présynaptique (tracés du bas) est dérivée par électrodes externes sur le nerf XI.

Pour des intervalles atteignant 10 à 12 ms (allant jusqu'à 15 ms pour d'autres expériences), le phénomène s'inverse et donne lieu à une phase de dépression, le second PPSE étant alors plus petit que le premier (il atteint dans l'exemple

choisi une diminution de 10 % pour un intervalle de 32 ms et s'estompe au-delà de 50 ms) (1).

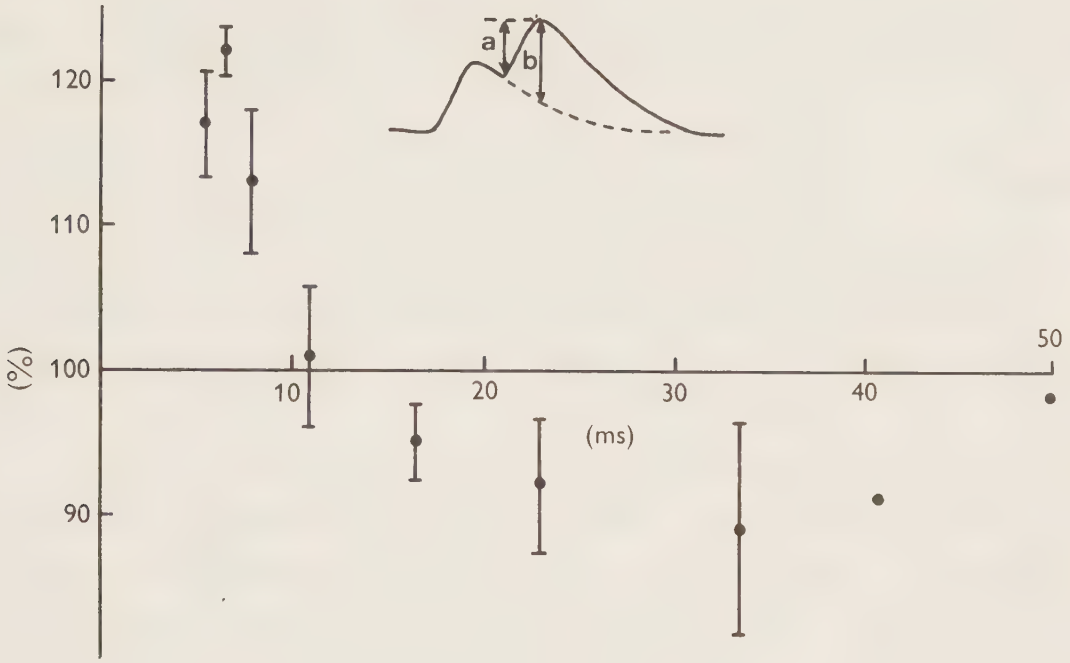


Fig. 52 - Facilitation et dépression synaptiques au cours d'une activité phasique. (voir illustrations partielles de la fig. 51). L'amplitude du second PPSE unitaire (a) de chaque volée est exprimée en pour cent du premier, en fonction de l'intervalle de temps qui les sépare. Tous les points, sauf les deux derniers, correspondent à la moyenne $\pm$ E.S. d'un minimum de 30 mesures. Pour des intervalles brefs (inférieurs à 10 ms), la superposition des deux PPSEs rend difficile l'évaluation de l'amplitude du deuxième (b). Une estimation approximative de b se traduit par une facilitation plus importante (voir texte).

(1) L'évaluation de l'amplitude du second PPSE n'est pas aisée lorsqu'il se greffe sur le premier. Ces difficultés sont liées à la durée brève des PPSEs, à leur amplitude relativement faible par rapport à l'épaisseur du tracé et à la nécessité d'extrapoler la phase de descente du premier PPSE pour évaluer plus justement l'amplitude du deuxième (mesure "b" sur le schéma de la fig. 52). Devant ces difficultés, nous avons établi la courbe de la fig. 52 en évaluant l'amplitude du second PPSE sans extrapoler la phase de descente du premier (mesure "a"). Dans ces conditions, pour des intervalles faibles, la valeur en pour cent de la facilitation est nettement sous-estimée. Nous avons en effet observé que pour certaines mesures faites par extrapolation, la facilitation atteint 200 % pour un intervalle de 4 ms (moyenne établie à partir de 46 mesures) et de 185 % pour un intervalle de 6 ms (n = 25).

Le phénomène de " fatigue " est illustré par la fig. 53. Lorsque les séquences sont relativement rapprochées, l'amplitude du premier PPSE de chacune d'elles diminue progressivement et devient souvent peu discernable par rapport au bruit de fond. Un repos de quelques minutes (2 à 3 mn) suffit pour assurer une restauration complète de la transmission.

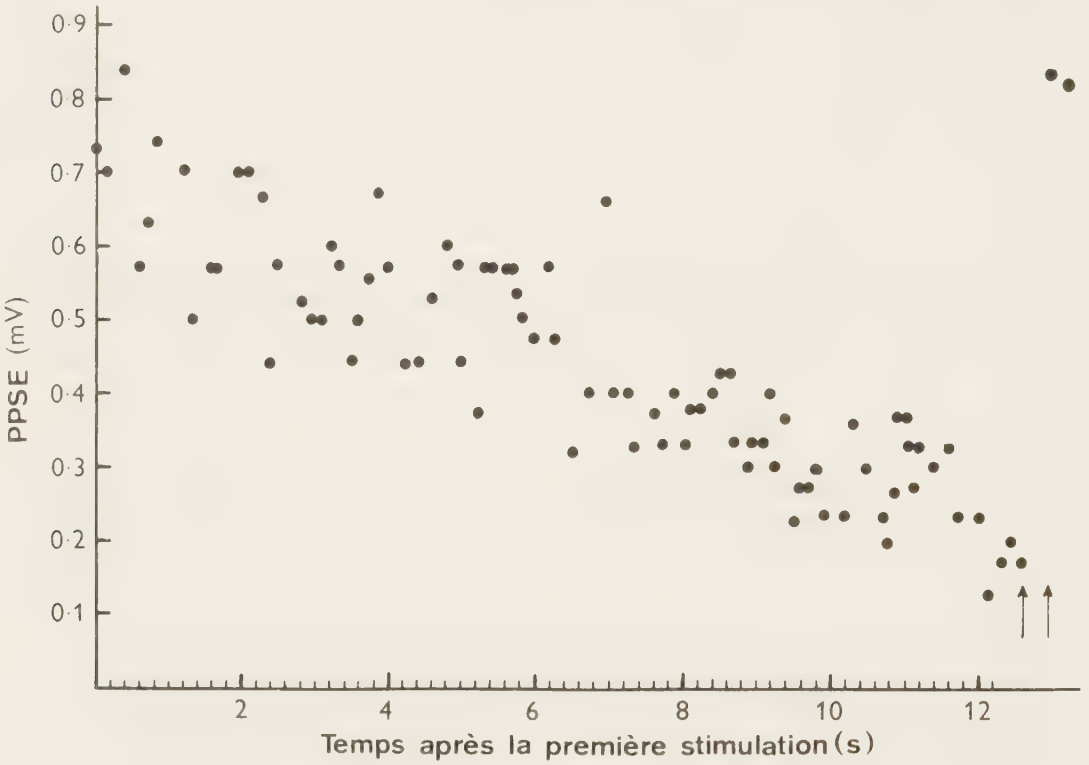


Fig. 53 - Phénomène de fatigue succédant à la stimulation mécanique répétée, à intervalles presque réguliers, d'un mécanorécepteur phasique (voir illustrations partielles sur la fig. 51). La variation de l'amplitude du premier PPSE unitaire de chaque volée est représentée en fonction du temps. Les deux flèches indiquent un repos de 3 mn qui rend possible une récupération complète.

Ce phénomène présente de grandes analogies avec celui décrit par BRUNER et TAUC (1965-1966, a et b) sous le nom d'habituation du PPSE à l'échelon unitaire, bien que chez l'Aplysie, les effets dus à la première stimulation durent bien plus longtemps et peuvent s'étendre sur 4 minutes environ.

2 - Stimulation électrique d'un seul récepteur.

Cette technique permet de déclencher et de contrôler, dans d'excellentes conditions, l'activité au niveau d'un seul mécanorécepteur parfaitement identifié. Associée à l'enregistrement de l'activité postsynaptique unitaire (par exemple au niveau de la fibre géante II), elle permet de suivre avec précision l'évolution de la réponse postsynaptique en fonction de la fréquence et même du nombre d'influx de la volée afférente. Ces paramètres sont en effet parfaitement réglables artificiellement, ce qui autorise aussi la reproductibilité des expériences. Il est évident qu'une telle étude, pour être complète, nécessiterait un grand nombre d'expériences et un travail considérable.

Nous nous proposons avant tout,dans ce paragraphe, de mettre l'accent sur les résultats qu'on peut en attendre. Nous avons pris comme exemple un mécanorécepteur tonique qui, dans les conditions de stimulation naturelle (fig. 50), ne permet pas une étude quantitative à cause de la relative limitation dans l'éventail des fréquences, en particulier en début de séquence.

La fig. 54 regroupe les résultats obtenus par stimulation électrique et montre l'évolution d'un PPSE-test succédant à divers intervalles de temps à un PPSE conditionnant. Cela permet par conséquent d'établir une étude quantitative sur les deux premiers PPSEs d'un message tonique (1).
La courbe qui peut en être déduite met en évidence (fig. 54 B), pour des intervalles inférieurs à 7 ms (correspondant à une fréquence de 140 par seconde environ), une facilitation du deuxième PPSE qui atteint 165 % pour une fréquence de 400 par seconde (valeur légèrement supérieure à la fréquence maximum d'un récepteur dans les conditions naturelles). Elle est suivie par une phase de dépression faible (5 à 10 %) qui peut durer plus de 50 ms.

L'étude de cet exemple permet donc de confirmer la présence d'une facilitation relativement importante que nous avions déjà observée en début de séquence (voir tableau VI) mais uniquement pour des intervalles de temps brefs, la phase dépressive ne se développant de façon importante qu'avec la répétition (fig. 50).

(1) Une étude quantitative sur un message plus long peut également être envisagée grâce à l'utilisation de salves conditionnantes de différentes fréquences comportant un nombre fini d'unités.

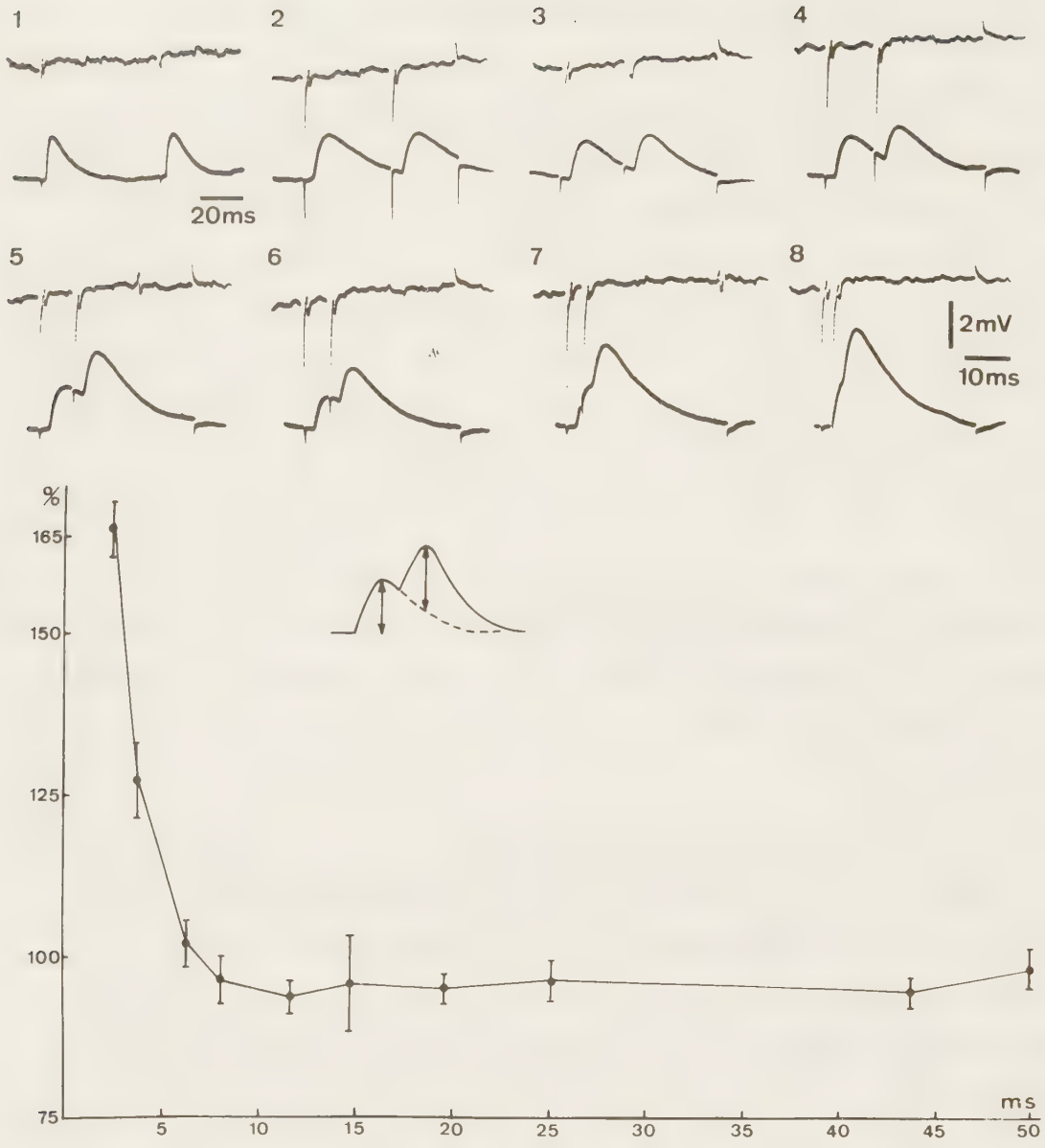


Fig. 54 - Facilitation et dépression synaptiques liées à l'activité d'un mécanorécepteur "tonique". Le mécanorécepteur est stimulé électriquement par l'intermédiaire d'une microélectrode piquée à la base de la soie externe et les potentiels d'action ainsi déclenchés sont dérivés par électrodes externes sur le nerf XI (tracés du haut).

A - Enregistrements sélectionnés montrant l'évolution d'un PPSE unitaire-test succédant à intervalles variables à un PPSE unitaire conditionnant (tracés du bas).

B - L'amplitude du second PPSE est exprimée en pour cent du premier, en fonction de l'intervalle de temps qui les sépare. Pour des intervalles de temps brefs, l'amplitude du PPSE-test est estimée par extrapolation.

Noter que la facilitation ne se manifeste que pour des intervalles de temps inférieurs à 6 ms environ et qu'elle est suivie par une légère phase de dépression. Chaque point correspond à la moyenne $\pm$ E.S. de 10 à 27 mesures.

C - STIMULATION REPETITIVE DE PLUSIEURS AFFERENCES.

Nous venons d'examiner comment se comporte la fibre postsynaptique lorsqu'elle est soumise à différents messages sensoriels issus de récepteurs stimulés isolément. Tous ces récepteurs répondent par des fréquences relativement élevées susceptibles d'engendrer une sommation temporelle plus ou moins importante. Nous allons voir maintenant si les mêmes phénomènes se retrouvent lorsqu'un grand nombre d'afférences sont sollicitées répétitivement.

Cette étude à été menée de deux façons:

- par stimulation mécanique naturelle portée sur l'ensemble des cerques (à l'aide d'un souffle d'air);
- par stimulation électrique des nerfs cercaux XI ou X.

1 - Stimulation naturelle des cerques.

Nous avons vu p.139 que même si les nerfs X " inhibiteurs " sont sectionnés, il est relativement difficile de déclencher une ou deux réponses propagées. Cela nécessite un stimulus mécanique assez puissant (fig. 31). Lorsque de tels stimuli relativement constants sont répétés à intervalles à peu près réguliers, nous observons, même pour une fréquence faible (2 par seconde), une diminution progressive mais rapide de l'amplitude de la dépolarisation ainsi induite (fig. 55). Elle se maintient ensuite à un niveau sensiblement constant. Il est à remarquer que le potentiel d'action déclenché par la première dépolarisation est supprimé dès le deuxième stimulus. Il suffit de laisser la préparation au repos pendant quelques minutes (5mn dans le cas présent) pour qu'elle recouvre entièrement les conditions de départ. Cette réduction d'amplitude peut être considérée comme un phénomène d'habituation (voir discussion). Il est vraisemblablement comparable à celui que nous avons mis en évidence par la stimulation d'un seul récepteur (fig. 53). Dans le cas

présent, il correspondrait à ce qui résulte de la stimulation d'un grand nombre de récepteurs (1).

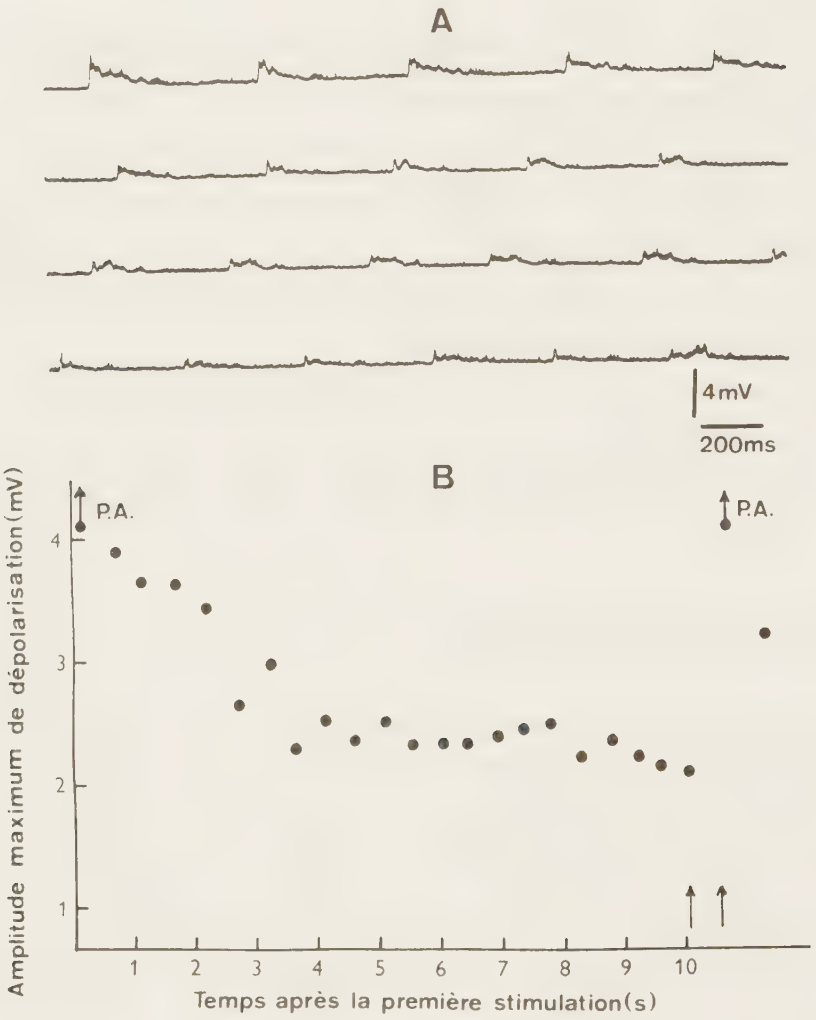


Fig. 55 - Habituation à l'échelon cellulaire de la dépolarisation postsynaptique induite par une stimulation répétitive des mécanorécepteurs cercaux.

A - Réponses postsynaptiques successives obtenues par des souffles d'air relativement constants et forts. Seule la première réponse donne un potentiel d'action propagé.

B - Courbe obtenue à partir des tracés du haut. Les deux flèches correspondent à un intervalle de temps de 5 mn assurant une récupération complète. P.A.= potentiel d'action.

(1) Il n'a jamais été possible de modifier ce phénomène au cours d'une séquence habituante par l'application d'un extrastimulus sur l'un des nerfs afférents, par exemple en mettant en évidence un phénomène de " déshabituation ". Cette étude mériterait cependant d'être reprise de manière plus systèmatique.

2 - Stimulation électrique répétitive des nerfs cercaux.

a - Stimulation des nerfs XI.

Afin d'étudier les effets de la stimulation électrique, trois précautions principales ont été prises:

- les nerfs cercaux sont sectionnés à la sortie des cerques afin de supprimer toute activité sensorielle " spontanée ";
- la stimulation électrique portée sur les nerfs reste légèrement en-dessous ou juste au seuil pour éviter la propagation de potentiels d'action (cette opération peut être remplacée par une hyperpolarisation modérée inférieure à 30mV pour ne pas introduire de modifications de la résistance membranaire par le courant appliqué (voir p. 151);
- un intervalle de temps de 3 à 5 mn permettant le repos et la récupération complète est ménagé entre chaque séquence de stimulation de façon à éviter autant que faire se peut une interférence avec le phénomène de dépression de longue durée ou une éventuelle potentiation post-tétanique.

α - Action sur le PPSE évoqué monosynaptique.

La fig. 56 permet de suivre l'évolution du PPSE initial (monosynaptique) pour des fréquences variées. Les effets dépresseurs de la stimulation répétitive se font déjà sentir pour des fréquences voisines de un stimulus toutes les trois secondes. Pour des fréquences inférieures à environ 25/s, l'amplitude du PPSE diminue tout d'abord plus ou moins rapidement, puis se stabilise au bout d'une dizaine de stimulations. Plus la fréquence est élevée, plus rapide est la chute du PPSE et plus bas est le plateau. Pour des fréquences supérieures à 25/s, l'amplitude des premiers PPSEs tombe rapidement, puis réaugmente avant de diminuer encore plus lentement vers le plateau. Ce phénomène de " rebond " est particulièrement visible dans la fig. 56 A_3 et B. Pour des fréquences supérieures à 100/s et allant jusqu'à 360/s (fréquence de fonctionnement maximum d'un récepteur), l'évaluation en amplitude de chacun des PPSEs est délicate du fait de la sommation.

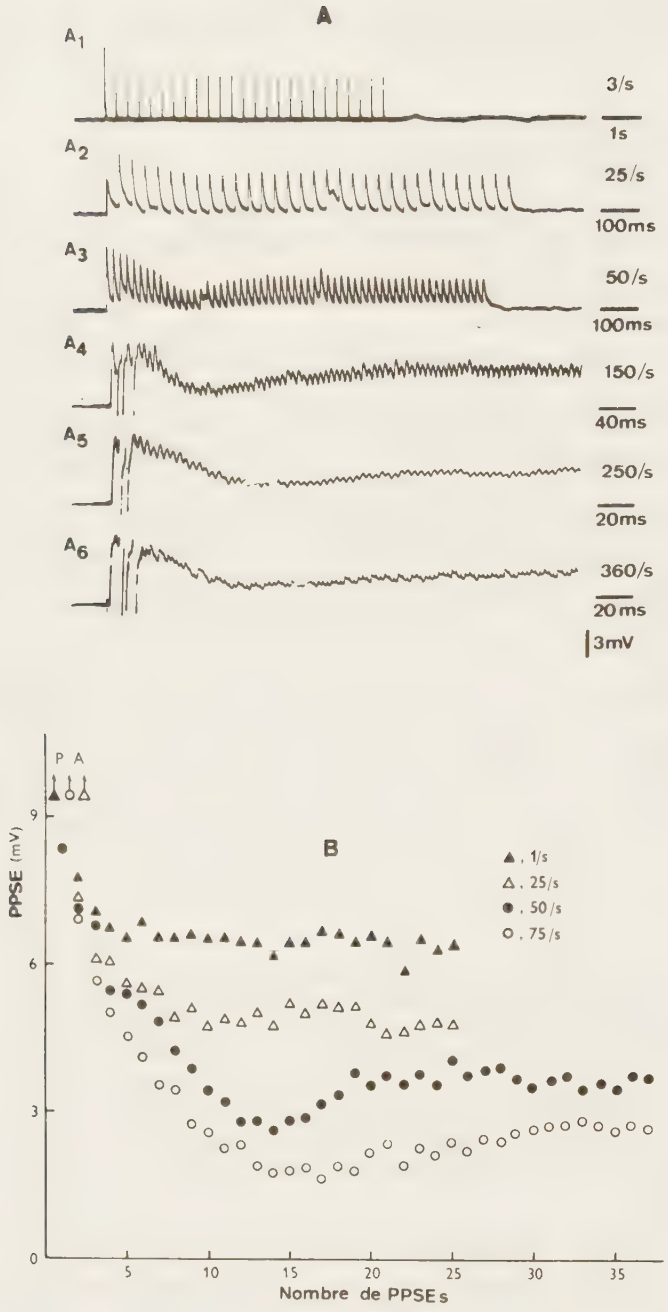


Fig. 56 - Action de la stimulation électrique répétitive du nerf cercal XI, à différentes fréquences, sur le PPSE monosynaptique.

Dans les exemples A_4, A_5 et A_6, la sommation des PPSEs déclenche deux ou trois potentiels d'action propagés avant que la composante de "fatigue" ne soit prépondérante.

B - Courbes traduisant l'évolution de l'amplitude de chaque PPSE en fonction de sa position dans la salve. Les PPSEs décroissent en fonction du temps, même à faible fréquence (1/s) et puis réaugmente (" rebond ", voir texte) après 10 à 20 stimulations, si la fréquence excède 25/s. P.A. = potentiels d'action greffés sur le premier PPSE de certaines séries.

β- Action sur les PPSEs retardés.

Nous n'avons pas entrepris une étude approfondie concernant ces PPSEs. Nous avons déjà dit p.144 que le second et le troisième PPSE sont plus labiles que le PPSE initial. Ils ne subissent cependant que peu de variations pour des fréquences voisines de un stimulus toutes les dix secondes.

b - Stimulation des nerfs X.

- Action sur le PPSI disynaptique.

La fig. 57 montre que le PPSI varie de la même façon que le PPSE sans que soit décelable le phénomène de rebond décrit plus haut. Cette expérience ne permet pas de préciser suffisamment les facteurs déterminants pouvant expliquer cette fatigue. Le circuit étant supposé au moins disynaptique, la réponse postsynaptique enregistrée peut comporter des effets de la stimulation répétitive affectant le premier relais.

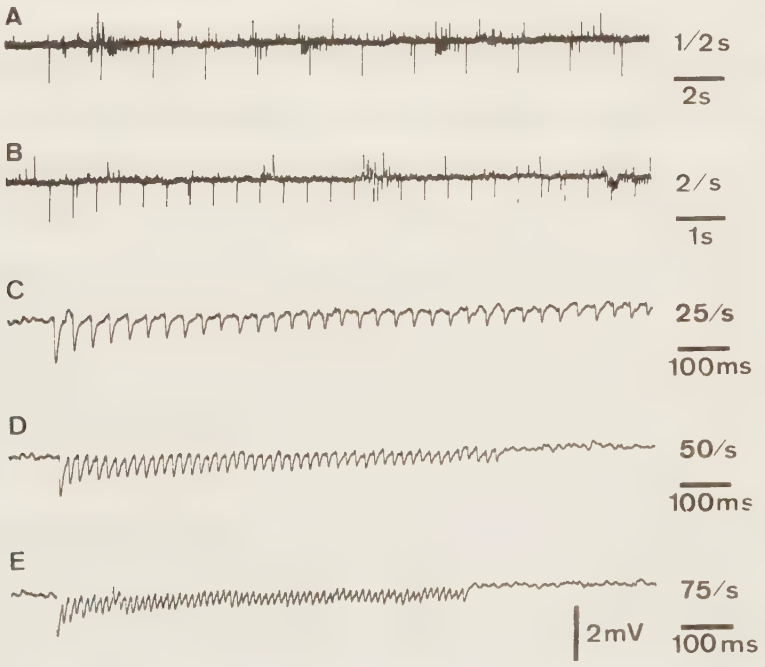


Fig. 57 - Action de la stimulation électrique répétitive du nerf cercal X, à différentes fréquences, sur le PPSI. Noter la présence de PPSEs et PPSIs unitaires " spontanés " sur les tracés A et B. La diminution d'amplitude commence à être sensible pour une fréquence voisine de 1/2s.

D - DISCUSSION : FACILITATION, DEPRESSION ET HABITUATION.

Il ressort de ces diverses expériences que la transmission synaptique entre les afférences cercales et la fibre géante II peut être modulée par deux principaux facteurs: facilitation et dépression. Ces deux phénomènes ont évidemment une importance majeure dans les propriétés intégratrices de cette synapse. Ils ont été étudiés, soit à l'échelon unitaire, par la stimulation de différentes sortes de mécanorécepteurs, soit d'une manière globale, par la stimulation mécanique ou électrique des nerfs afférents.

Facilitation et dépression ont été décrites au niveau de très nombreuses synapses chimiques; elles sont basées sur des mécanismes fondamentaux qui peuvent être localisés présynaptiquement (facilitation ou inhibition présynaptiques) ou postsynaptiquement (sensibilisation ou désensibilisation des sites récepteurs) (1). Les mécanismes présynaptiques peuvent être amorcés:

- soit par la stimulation d'une seule et même afférence (facilitation ou inhibition homosynaptiques) (2)
- soit par la mise en jeu de deux ou plusieurs afférences. Dans ce cas, elles empruntent le même nerf ou des nerfs différents et l'une d'elles exercerait son action sur les terminaisons présynaptiques de l'autre, au niveau d'une structure appelée " épisynapse " (TAUC, 1965) (facilitation ou inhibition hétérosynaptiques).

Quant à la notion d'habituation du PPSE, elle a été introduite par BRUNER et TAUC (1965 et 1966) chez l'Aplysie à la suite de la diminution progressive d'un PPSE unitaire déclenché électriquement ou d'un PPSE

(1) La facilitation a également été observée au niveau de synapses électriques (BENNETT et PAPPAS, 1967). Elle serait expliquée (BENNETT, 1968) par une altération dans les propriétés électriques des membranes pré- ou postsynaptique et notamment par une propagation plus aisée des potentiels présynaptiques dans les terminaisons.

(2) Dans ce cas, il faudrait pouvoir s'assurer que cette afférence ne mette pas en jeu d'inhibition hétérosynaptique, en retour, sur ses propres terminaisons, par l'intermédiaire d'interneurones. Cela paraît extrêmement difficile à contrôler pour des phénomènes rapides se succédant à grande fréquence.

composite dû à la répétition d'un stimulus appliqué au niveau d'un champ sensoriel donné. Dans les deux cas, la réponse habituante est comparable, ce qui renforce considérablement l'origine centrale du phénomène et écarte la possibilité d'une adaptation au niveau récepteur, suffisante pour expliquer à elle seule l'habituation. Cette notion a été reprise notamment par CASTELLUCCI, PINSKER, KUPFERMANN et KANDEL (1970) qui, par l'étude d'un réflexe complet (rétraction de la branchie chez l'Aplysie), ont confirmé l'origine centrale de l'habituation et de son mécanisme essentiellement présynaptique. Il est souvent possible de contrarier ses effets par stimulation d'une voie non habituée ou par modification de la fréquence sur la même voie. Si le PPSE récupère en tout ou en partie son amplitude initiale, il y a " déshabituation ".

Dans certains cas (en particulier chez l'Aplysie), l'application d'une seule stimulation peut entraîner des modifications de longue durée (facilitation ou inhibition), phénomènesqui peuvent servir de base à la compréhension de l'apprentissage, du conditionnement ou de mémorisation à plus ou moins long terme.

Analysons séparément chacun de ces trois phénomènes.

1 - Facilitation synaptique.

Ce phénomène, encore appelé potentiation, a fréquemment été décrit. Les principaux travaux dérivent d'expériences effectuées à la jonction neuromusculaire de Vertébrés (Amphibiens et Mammifères) où il a été étudié, soit à la suite d'un seul stimulus (voir notamment, MALLART et MARTIN, 1967; KATZ et MILEDI, 1968; RAHAMIMOFF, 1968), soit après une salve conditionnante qui est à l'origine du phénomène de potentiation post-tétanique (voir en particulier, DEL CASTILLO et KATZ, 1954; GAGE et HUBBARD, 1966; MALLART et MARTIN, 1967; MAENO et EDWARDS, 1969; ROSENTHAL, 1969; WEINREICH, 1971). Ces effets facilitateurs ont été retrouvés à la synapse neuromusculaire d'Invertébrés, en particulier chez des Crustacés (DUDEL et KUFFLER, 1961 ; DUDEL, 1965 a; SHERMAN et ATWOOD, 1971).

La facilitation est également connue dans le système nerveux central des Vertébrés (CURTIS et ECCLES, 1960; KUNO, 1964 b ; WILLIS et MAGNI, 1964; TSUKAHARA et KOSAKA, 1968; PORTER, 1970), et d'Invertébrés. Cependant, chez ces derniers, les exemples étudiés restent peu nombreux. Ils concernent essentiellement le Calmar (TAKEUCHI et TAKEUCHI, 1962; MILEDI et SLATER, 1966) et l'Aplysie (TAUC, 1958; FESSARD et TAUC, 1958). Chez l'Aplysie, un grand nombre de travaux ont été consacrés à l'étude de la facilitation hétérosynaptique (KANDEL et TAUC, 1964, 1965 a et b ; TAUC et EPSTEIN, 1967; VON BAUMGARTEN et JAHAN-PARWAR, 1967 ; VON BAUMGARTEN et HUKUHARA, 1969; CASTELLUCCI, PINSKER, KUPFERMANN et KANDEL, 1970; EPSTEIN et TAUC, 1970). On y rencontre également de la facilitation homosynaptique (par exemple, dans certaines cellules ganglionnaires du type CILDA) qui, à la suite d'une salve tétanisante, peut durer plusieurs minutes (TAUC, 1965).

Chez les Insectes, nous ne connaissons pas d'exemples de facilitation synaptique en dehors de nos résultats. Nous avons en effet montré, chez la Blatte américaine, que ce phénomène est décelable au début des séquences liées à l'activité de mécanorécepteurs phasiques et toniques, à condition que la fréquence instantanée atteigne au moins 100 à 200 influx par seconde (1). Le phénomène est toujours plus important dans le cas des récepteurs phasiques.

Où se trouve, chez la Blatte, le site responsable de cette facilitation ? Est-il localisé pré- ou postsynaptiquement ?

Les facteurs qui pourraient intervenir au niveau postsynaptique sont essentiellement une variation des caractéristiques électriques de la membrane (capable d'entraîner une augmentation de Rm) et une sensibilisation accrue des récepteurs subsynaptiques au médiateur qui serait libéré. Une éventuelle augmentation de la résistance membranaire paraît difficile à mesurer entre les PPSEs, d'une part parce qu'ils se produisent à fréquence élevée (au minimum 150/s) et que la période de facilitation ne subsiste que pendant les 10 premières

(1) Il est à noter que la facilitation observée dans le SNC de la Blatte est maximale pour des intervalles de temps comparables à ceux observés dans des motoneurones de Chat, pour des PPSEs de fibres I a (CURTIS et ECCLES, 1960; KUNO, 1964 b) ou dans des motoneurones de Singe, pour des PPSEs corticospinaux (PORTER, 1970).

millisecondes du message (fig. 52 et 54). Pour tester la deuxième possibilité, il est nécessaire d'avoir identifié le médiateur. Nous verrons dans le chapitre IV que les arguments apportés sont en faveur de l'ACh pour toutes les afférences excitatrices et que la membrane postsynaptique a au contraire une légère réaction désensibilisatrice (KATZ et THESLEFF, 1957; TAUC et BRUNER, 1963) vis-à-vis de cette substance (fig.83).

Des nombreux travaux cités plus haut , l'opinion qui se dégage est en faveur d'un mécanisme localisé essentiellement au niveau présynaptique. Nous rappellerons notamment qu'à la synapse neuromusculaire d'Amphibien, où le phénomène de facilitation a été l'objet d'investigations intensives, on invoque un mécanisme présynaptique (DEL CASTILLO et KATZ, 1954; KATZ et MILEDI, 1968), qu'il s'agisse de potentiation post-tétanique ou de facilitation succédant à un simple choc. Dans le SNC, pour des expériences relativement comparables aux nôtres, KUNO (1964 b) conclut que, dans les motoneurones de Chat, la facilitation implique uniquement des mécanismes présynaptiques. Il en est de même pour le mécanisme de facilitation hétérosynaptique chez l'Aplysie (KANDEL et TAUC, 1965 b) . Ainsi il paraît peu concevable d'admettre, chez la Blatte, un mécanisme exclusivement postsynaptique. Il se situe vraisemblablement avant tout au niveau présynaptique.

Quels mécanismes sont à la base de ce phénomène de facilitation? BIRKS et COHEN (1968) ont suggéré que l'accumulation des ions Na^{+} dans les terminaisons présynaptiques résultant d'une salve afférente, déplacerait les ions Ca^{++} fixés sur la surface interne de la membrane et entraînerait une entrée supplémentaire d'ions Ca^{++} et donc une augmentation de la libération de médiateur (KATZ et MILEDI, 1965 et 1967 a). Plus récemment, WEINREICH (1971) a suggéré que la potentiation post-tétanique ne nécessitait pas d'ions Na^{+}, mais dépendait uniquement d'un mouvement d'ions Ca^{++} pénétrant dans les terminaisons nerveuses. KATZ et MILEDI (1968) avaient montré que la facilitation liée à un seul choc conditionnant résultait aussi d'une accumulation d'ions Ca^{++} dans les terminaisons. Les deux phénomènes seraient donc essentiellement la conséquence du même mécanisme bien que leur durée d'action soit différente. A la synapse géante du Calmar, TAKEUCHI et TAKEUCHI (1962) ont expliqué la facilitation, uniquement par l'augmentation d'amplitude du potentiel d'action présynaptique. MILEDI et SLATER (1966)

ont montré, sur la même synapse, que ce n'est pas entièrement vrai et qu'il y a vraisemblablement un autre mécanisme non identifié.

Toutes ces expériences concourent à démontrer que la facilitation ou la potentiation post-tétanique ont comme point commun l'accroissement de la quantité de médiateur libéré. Il semble donc vraisemblable d'admettre, par analogie, que le même mécanisme est aussi à la base du phénomène de facilitation que nous avons avons décelé chez la Blatte, suite à l'activation homosynaptique de certaines afférences cercales.

2 - Dépression synaptique.

A l'inverse de la facilitation, la dépression diminue l'efficacité synaptique. Là encore, elle peut être décelée après un seul évènement présynaptique ou après une salve (dépression post-tétanique). Elle peut également être mise en jeu par l'activation homo-ou hétérosynaptique. Dans la plupart des cas, cette dépression relève de mécanismes présynaptiques (par exemple, la réduction du potentiel d'action présynaptique ou la déplétion du médiateur disponible) qui entraînent la diminution de la quantité de médiateur libéré. C'est le cas notamment pour le phénomène d'inhibition présynaptique (FRANK et FUORTES, 1957; ECCLES, ECCLES et MAGNI, 1961; TAUC, 1965 et 1968). Ils peuvent cependant être postsynaptiques (désensibilisation des sites récepteurs). La durée de cette dépression est relativement brève à la synapse neuromusculaire ou dans le SNC de Vertébrés. Elle dure habituellement entre quelques ms et 200 ms et n'excède que rarement une seconde. Par contre, l'effet dépressif peut être bien plus long chez l'Aplysie, où, à la suite d'un seul stimulus, il se fait encore sentir après un intervalle de 4 minutes (BRUNER et TAUC, 1965 et1966 b),intervalle qui peut atteindre plusieurs dizaines de minutes à la suite d'une volée conditionnante (TAUC , 1964 et 1965) .

La diminution de l'efficacité synaptique a été particulièrement étudiée à la synapse neuromusculaire (ECCLES, KATZ et KUFFLER , 1941 ; LILEY et NORTH, 1953 ; DEL CASTILLO et KATZ, 1954 ; TAKEUCHI, 1958 ;

LUNDBERG et QUILISH, 1953 a et b; HUBBARD, 1963; OTSUKA, ENDO et NONOMURA, 1962; THIES, 1965; BETZ, 1970) mais également dans le SNC de Vertébrés (CURTIS et ECCLES, 1960; FADIGA et BROOKHART, 1962; KUNO, 1964 b; AUERBACH et BENNETT, 1969), ou d'Invertébrés (FESSARD et TAUC, 1958; TAUC, 1964 et 1965; BRUNER et TAUC, 1964, 1965, 1966 a et b; CASTELLUCCI, PINSKER, KUPFERMANN et KANDEL, 1970).

Il est également fréquent qu'une phase de dépression succède à une phase de facilitation (KUNO, 1964 b) ou qu'une phase de relative facilitation se greffe sur une phase de dépression (HUBBARD, 1959; LUNDBERG et QUILISH, 1953 a ; CURTIS et ECCLES, 1960).

Chez les Insectes, il n'existe pas, à notre connaissance, d'exemples de dépression synaptique étudiée à l'échelon des potentiels postsynaptiques, et *a fortiori,* à l'échelon unitaire.

Nous avons vu, chez la Blatte, que ce phénomène est détectable dans de nombreux exemples. Il apparaît :

- au cours de l'activation homosynaptique de mécanorécepteurs toniques (fig. 50) ou phasiques (fig.52). Il succède, en particulier, à la suite d'une composante facilitatrice;

- au cours d'une succession de messages (par exemple, des messages phasiques, fig. 53). Ce phénomène a été qualifié d'habituation à l'échelon unitaire;

- ou bien encore pendant la répétition de la stimulation mécanique globale (habituation du PPSE composite, fig. 55) ou électrique (fig. 56 et 57).

Peut-on localiser, chez la Blatte, le ou les mécanismes responsables de ces diverses formes de dépression synaptique ?

Lorsque certains récepteurs émettent des messages dont la fréquence atteint ou dépasse 300 par seconde, la période réfractaire relative peut être à l'origine d'une certaine réduction en amplitude des potentiels d'action présynaptiques qui, par voie de conséquence, libéreraient moins de médiateur. On peut supposer également que les potentiels d'action envahissent irrégulièrement les terminaisons et qu'à haute fréquence, ils soient bloqués à une certaine distance des sites synaptiques.

Par contre, lorsque la fréquence des messages est faible, ce facteur ne peut plus être retenu. Pour des fréquences inférieures à 10 par seconde (notamment au cours de la stimulation électrique répétitive), il est alors possible d'intercaler des tests de conductance par chocs électrotoniques rectangulaires (voir fig. 18, B). Nous n'avons jamais pu observer une variation de Rm entre deux PPSEs, alors que leur amplitude diminue rapidement (fig. 56). Ces expériences permettent par conséquent d'exclure la participation de variations éventuelles des caractéristiques électriques de la membrane postsynaptique, tout au moins pour des fréquences relativement faibles. Cependant, au niveau postsynaptique, il est vraisemblable qu'une part de la dépression puisse être expliquée par une certaine désensibilisation des sites récepteurs (fig. 83). Celle-ci semble relativement faible pour pouvoir expliquer, à elle seule, la dépression observée.

Il paraît donc probable que le mécanisme essentiel de la dépression est situé présynaptiquement et qu'il concerne la diminution de la quantité de transmetteur disponible. Cette hypothèse est renforcée par le fait que dans ces divers cas, une période de repos assez longue (quelques minutes) est nécessaire pour assurer une récupération complète. Autrement dit, la " réserve " de médiateur disponible se vide relativement vite et il faut un certain temps avant qu'une nouvelle quantité soit mise à la disposition des influx afférents. Ce mécanisme peut être partiellement mis en évidence lors de stimulations électriques répétitives d'un grand nombre d'afférences. On observe alors une diminution rapide de l'amplitude du PPSE, suivie d'une stabilisation à un niveau plus ou moins élevé, variable selon la fréquence de stimulation. Ce niveau peut résulter (si on admet que les influx présynaptiques ne subissent que peu de variations, au moins aux basses fréquences, 25 à 75 par seconde) d'un équilibre entre la quantité de médiateur libéré lors de chaque stimulation et celle néoformée , le mécanisme de mise en disponibilité étant difficile à préciser. Cette possibilité se trouve renforcée par l'observation du phénomène de " rebond " (fig.56) pour des fréquences supérieures à 25 par seconde et qui a déjà été décrit par ELMQVIST et QUASTEL (1965) sur le muscle intercostal humain. Ces auteurs ont expliqué ce fait par la mise en route du mécanisme de mobilisation du médiateur plus ou moins rapidement après l'utilisation du stock immédiatement disponible à la libération. Cette hypothèse a été reprise par HUBBARD (1970) dans une revue récente.

Deux autres facteurs peuvent être associés aux effets dépressifs et présenter quelque importance. Le premier concerne, dans le cas d'un message tonique unitaire, la composante hyperpolarisante qui succède à la composante phasique initiale (fig. 50, D). On retrouve parfois cette hyperpolarisation après une dépolarisation relativement brève induite par la stimulation mécanique de l'ensemble des cerques (fig. 33). Cette hyperpolarisation post-tétanique, de durée relativement longue, pourrait être due à la mise en jeu d'interneurones inhibiteurs, ou de pompes métaboliques (voir p. 207). Le second est en relation avec la sommation des PPSEs unitaires qui, au cours de fréquences élevées, tendent à déplacer le potentiel de membrane vers E_{PPSE}, diminuant ainsi leur amplitude.

3 - Habituation

Le terme d'habituation dérive d'expériences comportementales. Il signifie qu'un stimulus constant répété devient de moins en moins efficace et qu'ainsi, il donne lieu à une réponse qui décroît graduellement.

Les progrès actuels, dus en particulier à la technique de la microélectrode capillaire, ont permis de localiser, essentiellement au niveau central, les mécanismes fondamentaux de ce phénomène. De tels changements ne sont cependant pas la propriété exclusive du SNC. Des modifications de longue durée ont en effet été décrites à la synapse neuromusculaire de l'Ecrevisse (BRUNER et KENNEDY, 1970; BRUNER et KEHOE, 1970). Une revue récente (ROWELL, 1970) révèle qu'il n'existe pas d'études de l'habituation au niveau synaptique chez les Insectes (habituation du PPSE selon BRUNER et TAUC (1964). Chez la Blatte, ce phénomène a pourtant été largement étudié et démontré par des techniques comportementales et par l'enregistrement de l'activité globale, par exemple au niveau des nerfs cercaux et des connectifs. Ces techniques ont permis de localiser, dans le cadre du réflexe de fuite, un premier niveau d'habituation dans le ganglion A_6 de *Periplaneta americana* (HUGHES, 1965) et de *Blabera fusca* (ZILBER-GACHELIN, 1966, thèse, 1970).

Nos expériences ont montré que, au cours de stimulations répétées, le PPSE unitaire (fig. 53) aussi bien que la réponse à la stimulation mécanique globale (fig. 55) subissent dans les deux cas une diminution dont les caractéristiques temporelles sont comparables. Dans le premier cas, les potentiels d'action présynaptiques sont dérivés à l'entrée du ganglion A_6, ce qui permet d'exclure la participation d'une adaptation éventuelle au niveau sensoriel et d'admettre la même chose, par comparaison, pour la stimulation globale.

Nous avons par conséquent de bonnes raisons de penser que l'habituation du PPSE peut être considérée comme le mécanisme central responsable de l'habituation de ce réflexe (ou au moins une part, car le réflexe de fuite serait également transmis par des fibres plus petites que les fibres géantes (DAGAN et PARNAS, 1970). La discussion du sous-chapitre précédent a fortement mis en relief que les effets dépressifs ont leur fondement au niveau présynaptique. On peut donc logiquement admettre que l'habituation est liée en grande partie à une diminution de la quantité de médiateur libéré.

E - CONCLUSION PARTIELLE .

Au cours de ce chapitre sur la stimulation répétitive, nous avons montré combien la transmission synaptique pouvait subir de profondes modifications et qu'il est extrêmement rare que deux influx successifs produisent des effets postsynaptiques identiques, même s'ils proviennent de la même source. Cela montre combien un centre nerveux, aussi simplifié soit-il, reste d'une extrême complexité et qu'il présente des propriétés dynamiques liées aussi bien aux éléments présynaptiques (essentiellement dans les terminaisons) que postsynaptiques. Nous pouvons ainsi dire avec TAUC (1967) que "les propriétés des neurones pré-et postsynaptique dépendent étroitement de leur histoire récente ou moins récente ".

Les modifications que nous avons observées chez la Blatte sont brèves et diffèrent en cela de celles rencontrées chez l'Aplysie, modifications qui peuvent affecter la transmission pendant de nombreuses minutes, voire des heures.

Il n'est pas impossible que de telles possibilités existent chez la Blatte car, au niveau du ganglion A_6, nous avons rencontré une seule fois des effets dépressifs s'étalant sur plusieurs secondes (fig. 58). Dans ce cas unique, le PPSE, vraisemblablement monosynaptique et unitaire, était d'origine inconnue, de grande amplitude (8 à 9 mV), et déclenché par la stimulation du nerf X. Le PPSE-test, succédant au PPSE conditionnant déclenché homosynaptiquement, subit une diminution nette (de l'ordre de 25 %) pendant les cent premières millisecondes. Il retrouve ensuite très progressivement son amplitude initiale; la récupération complète ne survenant que pour un intervalle de 25 à 30 secondes.

Bien qu'aucun contrôle précis ne puisse être fait au niveau des terminaisons synaptiques, nous avons montré, par analogie avec les résultats obtenus sur de nombreuses préparations, que les mécanismes responsables des effets dépressifs sont probablement présynaptiques, et que l'hypothèse la plus vraisemblable tient compte d'un appauvrissement de la quantité de médiateur libéré au cours de stimulations répétées. Cependant, lorsque la fréquence est élevée, nous avons aussi admis que la période réfractaire

relative ainsi que des perturbations de la propagation des influx dans les terminaisons présynaptiques peuvent avoir quelques effets.

Par contre nous n'avons aucune certitude quant à la localisation des mécanismes responsables des effets facilitateurs observés sur les PPSEs unitaires de type phasique et " tonique ". Nous pensons néanmoins qu'ils se situent présynaptiquement.

En mettant en évidence que les effets postsynaptiques diffèrent selon la nature des mécanorécepteurs stimulés, nous voulons insister sur la signification des diverses catégories de messages aboutissant à un même élément. Par l'analyse aussi fine que possible de ces messages, nous montrons que chacun d'eux joue un rôle particulier dès le premier relais central. Les propriétés particulières observées lors de la stimulation répétitive d'une afférence donnée (phasique, tonique ou phasico-tonique) paraissent par conséquent spécifiques de cette afférence et non de la cellule postsynaptique. La possibilité de stimuler électriquement directement un seul récepteur identifié rend possible une étude plus approfondie et systématique de la question. Nous pensons qu'il y a là une voie intéressante à prospecter.

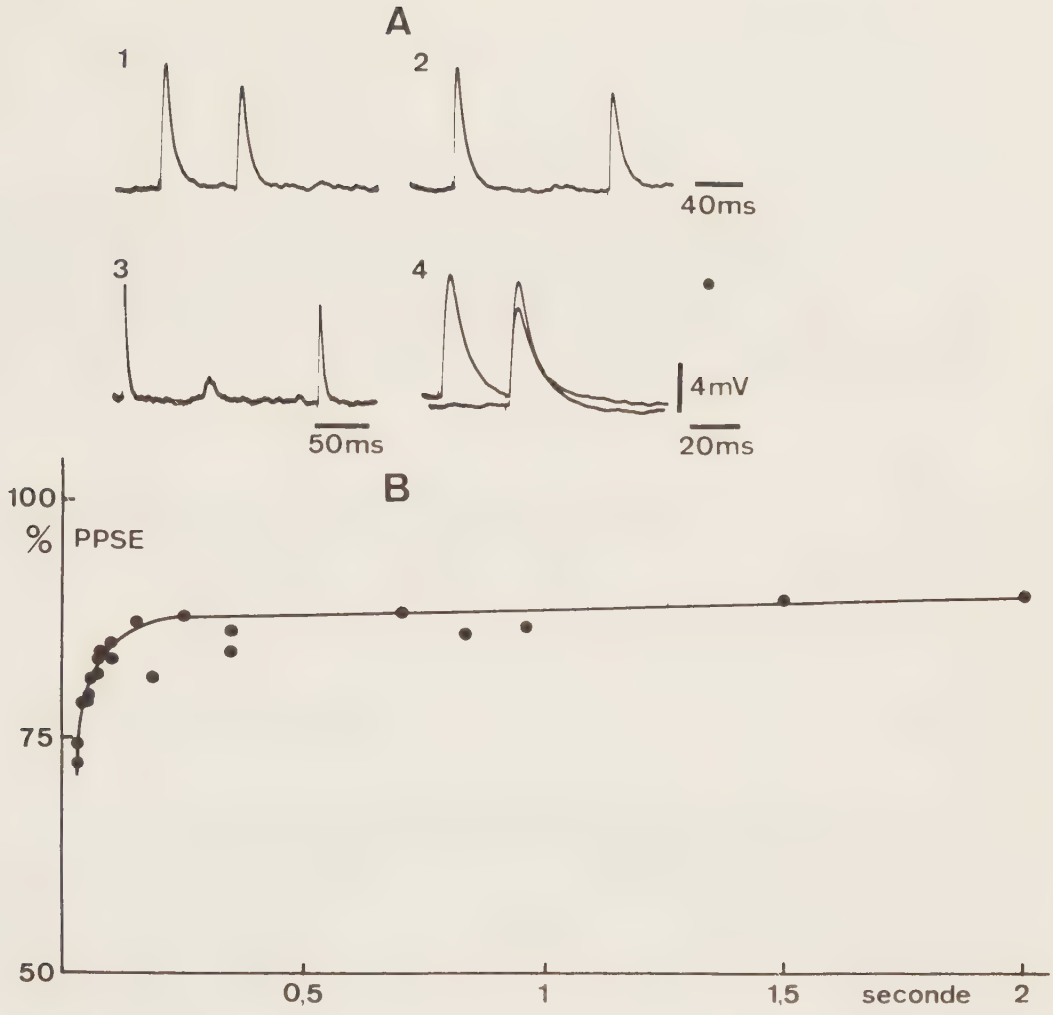


Fig. 58 - Effets dépressifs de longue durée dans le SNC de la Blatte. L'activation homosynaptique du nerf cercal X déclenche un PPSE monosynaptique apparaissant en tout ou rien, et ayant de ce fait, les caractères d'un PPSE unitaire. Le PPSE-test subit un décrément qui peut atteindre 25 %, lorsqu'il succède à un PPSE-conditionnant. Les effets dépressifs se font sentir sur 25 à 30 secondes.

En A sont représentés quelques exemples de stimulations couplées. Sur la photo n°4, sont superposés le PPSE seul (tracé inférieur) et le PPSE - test associé au PPSE - conditionnant (tracé supérieur) .

En B, le PPSE-test est exprimé en " pour cent " de l'amplitude du PPSE-conditionnant, en fonction du temps qui les sépare.

Chapitre III

Influences de facteurs essentiels à la transmission synaptique : importance de l'environnement intraganglionnaire.

A - ROLE DE L'OXYGENE ET DU GAZ CARBONIQUE

1 - Résultats expérimentaux.

Après la mise en place de la préparation dans la cuve à expérimentation, la transmission synaptique au niveau du ganglion A_6 est généralement bloquée. Ce blocage est d'autant plus complet que le ganglion est " noyé " au sein du liquide physiologique. Lorsqu'il affleure à la surface, il subsiste le plus souvent une transmission partielle.

a - Dès la mise en route du liquide physiologique circulant (liquide non enrichi artificiellement en gaz),on observe au niveau postsynaptique, en quelques secondes, une variation de potentiel dans le sens positif, c'est-à-dire hyperpolarisante par rapport aux conditions basales. Dans tous les cas (fig. 59), la courbe débute par un front relativement raide (1,5 à 3 mV/mn), passe par un maximum en 4 à 6 minutes et se prolonge par une dépolarisation très lente qui tend progressivement vers un état stable, atteint en une demi-heure environ. La fig. 59 montre 7 courbes, toutes obtenues dans les mêmes conditions: le ganglion est " noyé " au sein du liquide et le temps qui sépare le début de la dissection de la mise en circulation du liquide physiologique est

exactement de 60 minutes . On peut observer que toutes ces courbes évoluent sensiblement de la même façon. Lorsque le temps de mise en route s'allonge, la courbe tend à atteindre l'état stable d'une manière régulière, sans passer par un maximum et le niveau de dépolarisation augmente. Il peut atteindre 40 mV au bout de deux heures. Ce niveau est d'autant plus faible que le temps de mise en route est réduit et atteint au minimum 6 mV.

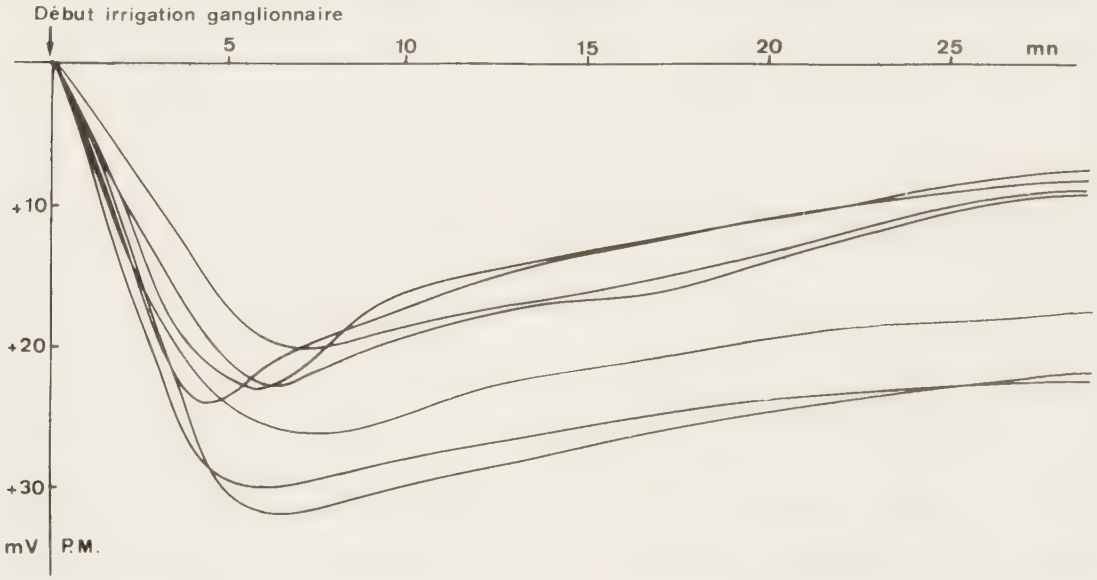


Fig. 59 - Effets de la mise en circulation du liquide physiologique sur le potentiel de membrane (P.M.) de sept préparations différentes ayant été disséquées et mises en place en 60 minutes (voir texte).

La récupération de la transmission se fait très progressivement et assez rapidement (fig. 60). Elle se fait parallèlement au rétablissement de la résistance et de la polarisation membranaires. Dans l'exemple choisi pour illustrer la fig. 60, nous avons stimulé électriquement le nerf cercal XI homolatéral, pendant la phase de " repolarisation ". La stimulation maximale (mettant en principe en activité toutes les fibres cercales) ne donne au début que le potentiel cercal transmis électrotoniquement. (1)

(1) Il est à remarquer que ce potentiel peut ici atteindre près de 1 mV, ce qui correspond au maximum d'influence électrotonique possible dans cette préparation, dans le sens nerf cercal-fibre géante.

- Une à deux minutes après le début de l'irrigation, le PPSE commence à apparaître.

- Au bout de 5 à 6 minutes, les premiers PPSEs unitaires deviennent visibles.

- Au bout de 7 à 8 minutes, le PPSE engendre le potentiel d'action propagé.

- Par la suite, le seuil diminue (autrement dit , le nombre de fibres cercales nécessaires pour engendrer un potentiel d'action diminue) et se stabilise approximativement en même temps que la préparation atteint son état stable.

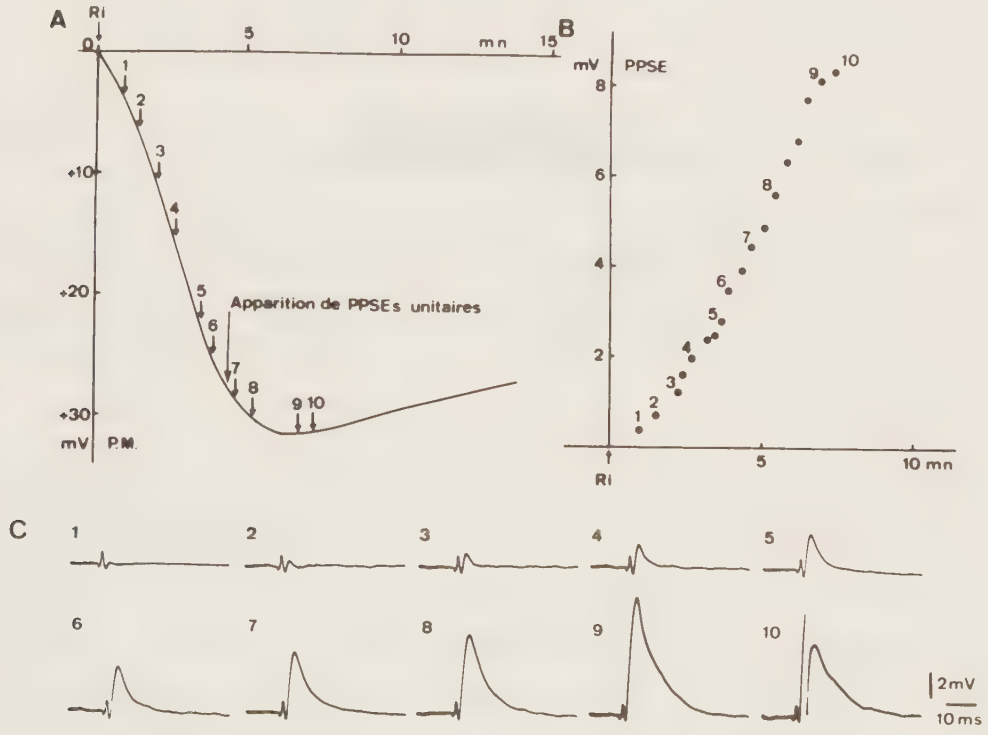


Fig. 60 - Effets de la mise en circulation du liquide physiologique sur la récupération de la transmission synaptique.

A - Repolarisation de la fibre géante qui débute dès la mise en circulation (Ri). Aux endroits fléchés et chiffrés correspondent les enregistrements sélectionnés en C. P.M. = potentiel de membrane.

B - Accroissement du PPSE déclenché par la stimulation maximale du nerf XI homolatéral, au cours de la repolarisation membranaire.

C - Quelques exemples d'enregistrements du PPSE au cours de la repolarisation membranaire. Noter la présence d'un potentiel cercal électrotonique d'amplitude constante précédant le PPSE, et l'apparition du potentiel d'action propagé sur la photo n° 10 .

L'arrêt de l'irrigation ganglionnaire entraîne, inversement, une dépolarisation progressive (fig. 61),parallèlement à une augmentation du seuil et à une diminution de la résistance. La fig. 61 montre que si on remet en perfusion à différents moments de la dépolarisation (Ri_1 et Ri_2), la récupération est immédiate et parfaitement symétrique. Au-delà, la dépolarisation s'accentue plus rapidement et donne bientôt une salve plus ou moins longue de potentiels d'action propagés. La vitesse de dépolarisation, très rapide au début (il suffit en moyenne de 5 mn pour déclencher la salve de potentiels d'action),diminue ensuite jusqu'à un niveau de stabilisation correspondant au silence de la préparation et à un blocage complet de la transmission. A ce moment, l'impédance totale n'excède pas 1,5 MΩ , alors qu'elle atteint 2 à 4 MΩ dans les meilleures conditions de la transmission. L'application de chocs électrotoniques dépolarisants est cependant capable de produire des potentiels d'action, ce qui permet de conclure que la portion axonique de la fibre géante reste encore en grande partie excitable. La chute d'impédance observée paraît par conséquent avant tout localisée au niveau neuropilaire, vraisemblablement au niveau synaptique. Tous ces effets sont parfaitement réversibles, par exemple en Ri_3, juste à la fin de la salve ou ultérieurement, à n'importe quel moment, même au bout de deux heures.

Ces différents faits montrent l'extrême sensibilité de notre préparation à quelque facteur qu'il s'agit de déterminer. Ce facteur particulier est nécessairement apporté par le liquide physiologique circulant, mais il ne semble pas dépendre de sa concentration ionique, puisqu'elle ne subit aucune variation. Porte-t-il alors sur la concentration en gaz dissous: O_2 et CO_2? Si cette hypothèse est vraie, le liquide circulant apporte un renouvellement constant en gaz, ce qui est d'ailleurs d'autant plus nécessaire que le ganglion se trouve sous une plus grande épaisseur de liquide.

b - Les expériences suivantes tentent de fournir une réponse à la question posée.

Si l'on fait barboter un mélange carbogène (95% O_2 + 5% CO_2) dans le liquide stagnant, la préparation se repolarise immédiatement suivant une courbe à peu près similaire aux précédentes quoique souvent de plus faible amplitude (fig. 62).

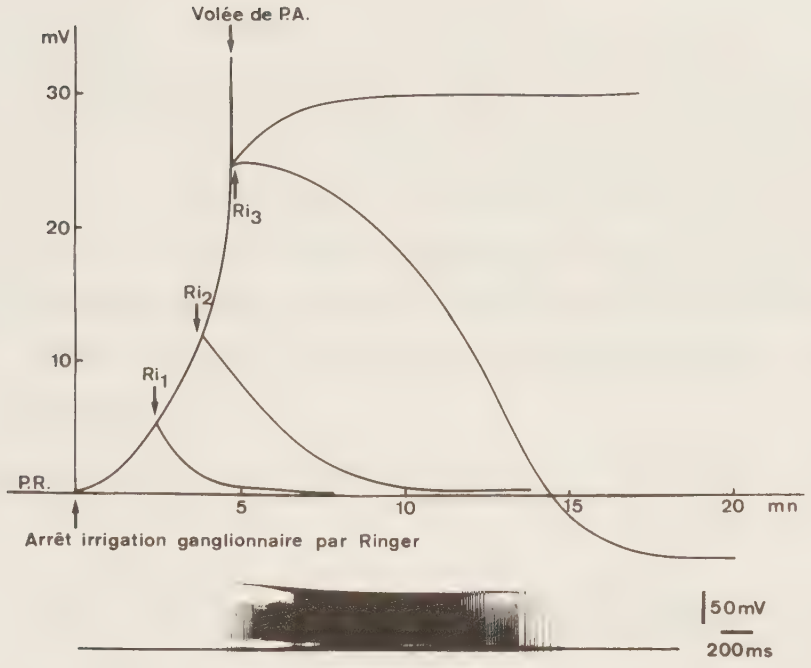


Fig. 61 - Arrêt de l'irrigation du ganglion A_6 par le liquide physiologique: effets sur le potentiel de membrane. La fibre géante se dépolarise très rapidement ce qui amène le déclenchement d'une volée de potentiels d'action (P.A.) dont un exemple est donné par l'enregistrement placé sous la courbe. La remise en circulation en différents points de la courbe (Ri_1, Ri_2 et Ri_3) entraîne la repolarisation complète et la récupération de la transmission (voir fig. 60). Elle est pratiquement symétrique si la dépolarisation n'est pas complète (Ri_1 et Ri_2). P.R. = potentiel de repos.

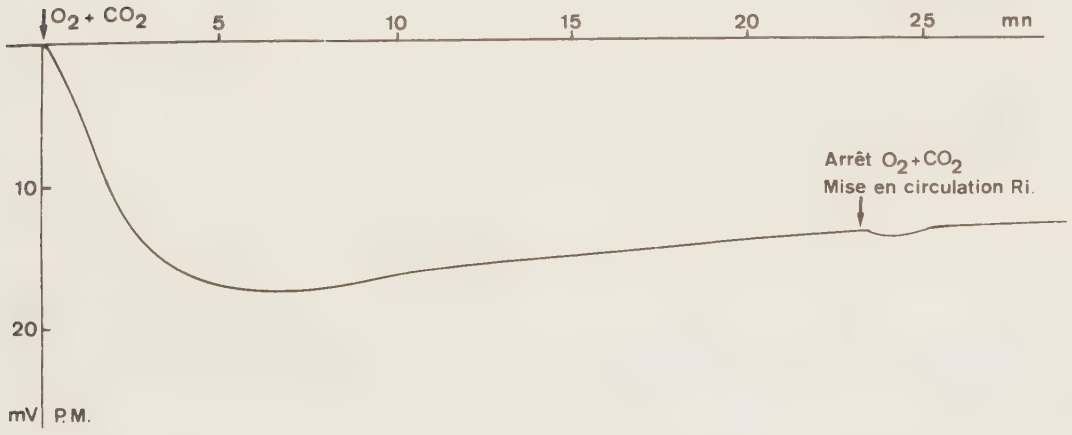


Fig. 62 - Action d'un mélange carbogène (O_2 = 95 %, CO_2 = 5 %) sur une préparation dépolarisée et dont la transmission synaptique est bloquée (liquide physiologique non circulant). Le barbotage des gaz entraîne la repolarisation immédiate et la récupération de la transmission. L'arrêt du barbotage gazeux et la mise en circulation du liquide physiologique (Ri) ne perturbent pas la poursuite de la repolarisation. P.M. = potentiel de membrane.

La récupération de la transmission synaptique se fait dans les mêmes conditions. Si l'on remplace le barbotage gazeux par la mise en circulation du liquide physiologique, le processus de récupération et de stabilisation se poursuit (on note seulement un léger artéfact de mouvement).

Au cours de la dépolarisation succédant à l'arrêt du liquide circulant, le barbotage du même mélange gazeux (fig. 63) permet la repolarisation suivant une courbe qui est dans ce cas, parfaitement symétrique. L'arrêt du barbotage entraîne une dépolarisation normale suivie d'une salve.

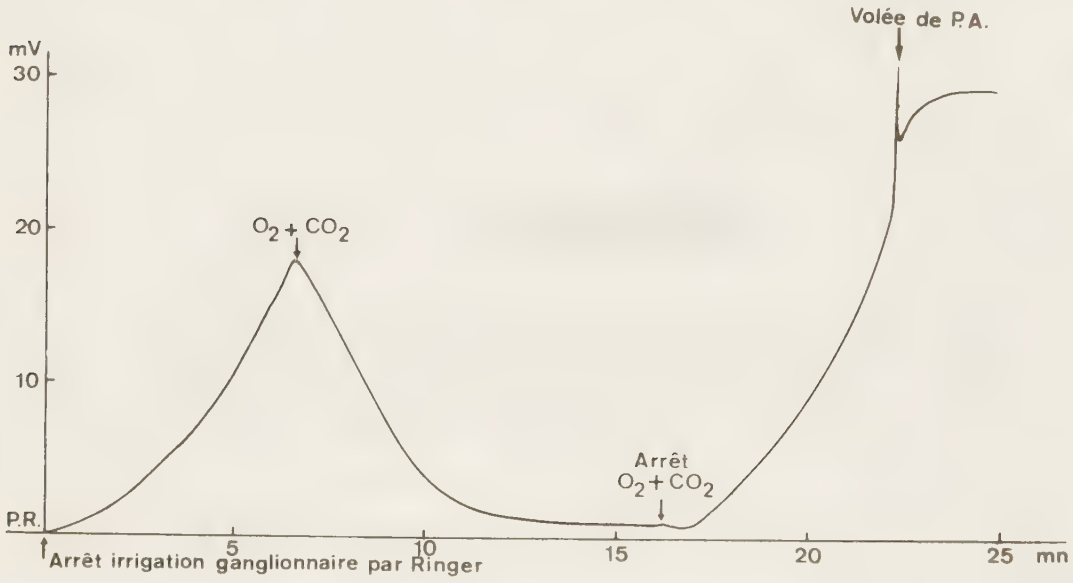


Fig. 63 - Effets d'un mélange carbogène (O_2 = 95 %, CO_2 = 5 %) sur la dépolarisation amorcée par l'arrêt de l'irrigation ganglionnaire par le liquide physiologique. On observe une récupération complète et parfaitement symétrique. L'arrêt du barbotage gazeux entraîne à nouveau la dépolarisation et la salve de potentiels d'action (P.A.). P.R.= potentiel de repos.

L'oxygène pur permet également la récupération, mais la plupart du temps, elle est partielle ou très lente (fig. 64).

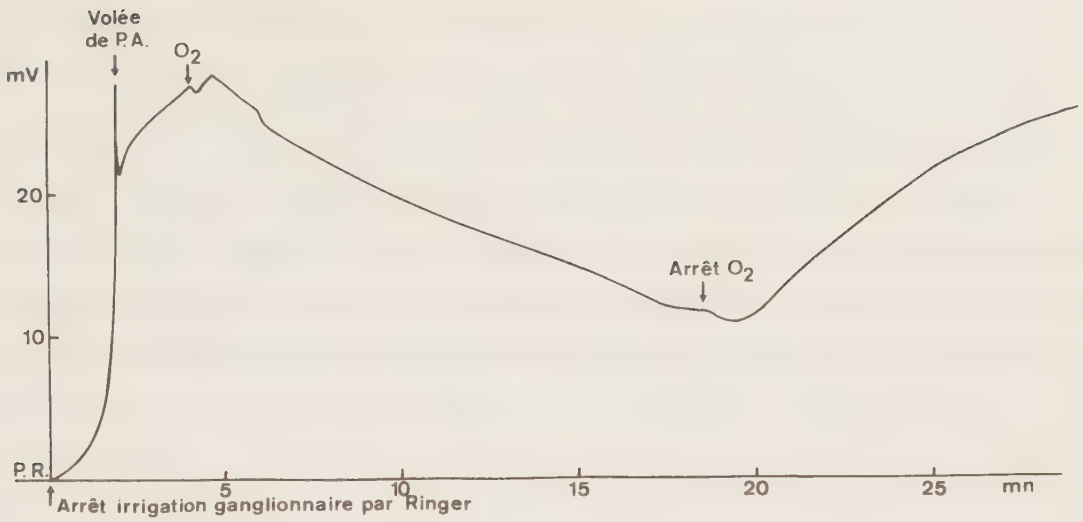


Fig. 64 - Effets de l'oxygène pur (100%) sur la repolarisation membranaire d'une préparation préalablement dépolarisée par l'arrêt de l'irrigation ganglionnaire. La récupération est dans ce cas rarement complète.

c - Si l'on applique le même mélange gazeux sur la préparation tenue en bon état par le liquide physiologique circulant, il déclenche souvent une intense activité postsynaptique (fig. 65, tracé n°3).

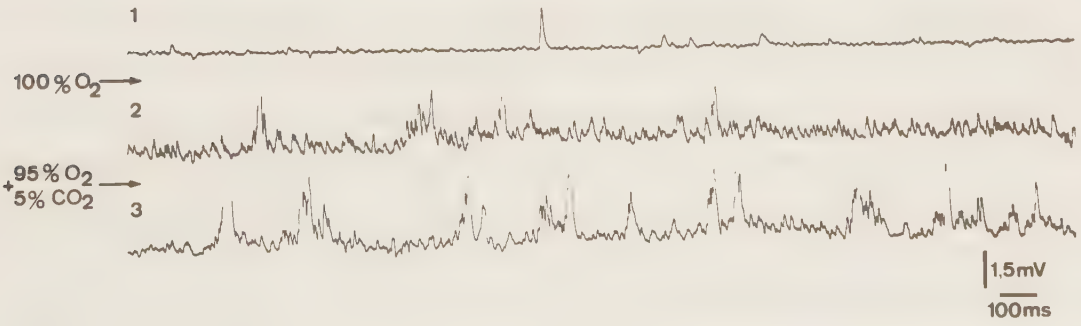


Fig. 65 - Activité postsynaptique (PPSEs et PPSIs unitaires) déclenchée par un barbotage gazeux (100% O_2 ou 95% O_2 + 5% CO_2) sur une préparation en bon état (liquide physiologique circulant). Elle témoigne indirectement, de l'action des gaz sur les terminaisons présynaptiques.

Elle apparaît et se développe en 2 à 3 minutes et s'estompe graduellement, après retrait du mélange gazeux, également en 2 à 3 minutes. Parallèlement, la résistance postsynaptique (Rm) augmente de 30 à 40 %. Dans tous les cas, cette activité comprend des PPSEs et PPSIs unitaires qui correspondent nécessairement à des potentiels d'action présynaptiques. Le mélange O_2 + CO_2 exerce par conséquent, dans ces conditions, une influence excitatrice, notamment au niveau des terminaisons présynaptiques. L'oxygène pur (100%) est également actif mais à un moindre degré (fig. 65, tracé n°2).

2 - Discussion.

Nos expériences indiquent clairement que l'oxygène et, à un moindre degré, le gaz carbonique, ont un rôle extrêmement important sur le ganglion A_6. Les effets observés sont essentiellement liés à la membrane postsynaptique mais ils intéressent également les terminaisons présynaptiques. Le trait le plus frappant est l'extrême rapidité des effets, en l'absence d'oxygène. Cela dénote sans doute l'existence d'un équilibre dynamique qu'il est aisé de rompre.

On peut dire que d'une manière générale, nous possédons relativement peu d'informations sur les effets de O_2 et CO_2 sur la transmission synaptique. Cela semble lié en grande partie à des difficultés techniques. Des essais ont été tentés par exemple dans les motoneurones de Chat (KOLMODIN et SKOGLUND, 1959; NELSON et FRANK, 1963; ECCLES, LOYNING et OSHIMA, 1966; COLLEWIJN et VAN HARREVELD, 1966) ou à la synapse neuromusculaire du diaphragme de Rat (HUBBARD et LOYNING, 1966). Dans ces exemples, un milieu déprimé en O_2 se traduit par des mouvements de tissus entraînant la sortie de la microélectrode. Chez l'Aplysie, l'anoxie se traduit également par une dépolarisation des corps cellulaires. Elle peut entraîner le développement d'une activité spontanée rythmique (CHALAZONITIS, 1963). Malgré ces difficultés et en opérant par recoupements, COLLEWIJN et VAN HARREWELD (1966) ont obtenu des effets sur le potentiel de membrane se traduisant par une dépolarisation relativement rapide (3 à 4 mV/mn). Le temps de latence est comme chez la Blatte extrêmement court (quelques secondes).
Selon ces auteurs, la dépolarisation observée pourrait être due à l'arrêt du fonctionnement d'un mécanisme de pompage actif des ions Na^+ et K^+. Le temps

de latence très court indiquerait que la réserve en phosphates à haute énergie disponibles pour le fonctionnement des pompes est faible .

On sait en effet que lorsqu'un nerf conduit des influx, les ions Na^+ s'accumulent dans l'axoplasme, parallèlement à la perte d'ions K^+. Il s'ensuit une période de récupération, pendant laquelle la balance ionique est rétablie à son niveau initial par le rejet actif d'ions Na^+ et la rentrée active d'ions K^+. Le sodium sort contre un gradient électrochimique, ce qui nécessite une dépense d'énergie métabolique, que témoigne un accroissement de consommation d'oxygène (voir notamment BAKER, 1965; RITCHIE, 1967; RANG et RITCHIE, 1968). Il s'agit de mécanismes de pompage actif du sodium, pompe qui est stimulée par un accroissement de la concentration interne en ions Na^+ et peut-être aussi par la présence d'ions K^+ dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessite l'intervention de l'ATP comme phosphate à haute énergie. HUBBARD et LOYNING (1966) pensent également qu'à la synapse neuromusculaire, l'hypoxie réduit le transport actif du sodium et du potassium ce qui conduit à une dépolarisation.

Une telle hypothèse est très séduisante pour expliquer les phénomènes que nous avons observés chez la Blatte. Nous pouvons tout d'abord remarquer que la fibre géante est soumise à une activité extrêmement dense qui ne peut que s'accroître lors de la manipulation de l'Insecte au cours de la dissection. Cette activité, sous forme de PPSEs unitaires en particulier, provoque une entrée massive d'ions Na^+ au niveau synaptique. Parallèlement, la préparation, isolée de l'animal, se trouve progressivement privée en oxygène (même si on maintient intact le réseau trachéen périganglionnaire). La pompe à sodium se ralentit et est vraisemblablement complètement stoppée à la fin de la mise en place, ce qui explique le blocage synaptique. La mise en circulation du liquide physiologique assurerait un apport nouveau d'O_2 qui permettrait à la pompe de retrouver l'énergie nécessaire à l'expulsion du sodium. Il serait intéressant de tester l'action de l'ouabaïne (glucoside connu pour affecter le mécanisme actif de rejet des ions Na^+), ou d'inhibiteurs métaboliques . De même il serait possible de modifier la concentration en ions K^+ pour voir si cet ion a également un rôle vis-à-vis du mécanisme de pompage. Nous pensons que notre préparation peut constituer un bon exemple pour l'étude centrale des pompes métaboliques, car elle ne pourrait pas être perturbée par l'utilisation de microélectrodes.

Nos expériences nous ont également permis d'observer que le CO_2 à faible concentration (5%) a une certaine action pré-et postsynaptique. Au niveau présynaptique, cela se traduit par une augmentation de l'excitabilité capable d'induire des potentiels d'action (PPSEs unitaires postsynaptiques). Au niveau postsynaptique, il semble que le CO_2 à faible concentration complète l'action de l'oxygène, sans que nous puissions dire où exactement et comment il agit. Il apparaît dans la littérature que l'action du CO_2 sur le SNC est relativement mal connue. BOISTEL et CORABOEUF (1954 b) et BOISTEL (1960) ont montré que le CO_2 a une action facilitatrice sur la chaîne de Blatte, à condition que le liquide physiologique soit glucosé et que l'animal soit en bon état physiologique. Plus récemment, MORRIS (1971) a au contraire observé dans la moëlle de Chat que les fibres afférentes sont déprimées (blocage de la conduction) sous CO_2 dont la concentration est comprise entre 2 et 20 % tandis que la transmission synaptique serait au contraire facilitée. Certaines cellules d'Aplysie sont dépolarisées par le CO_2 à 50 % (CHALAZONITIS, 1959 et 1963). WALKER et BROWN (1970) ont en outre montré que d'autres cellules sont hyperpolarisées ou aucunement affectées par le CO_2 à 5%.

En conclusion, la concentration du milieu environnant en oxygène et en gaz carbonique s'avère capitale pour le fonctionnement du ganglion A_6, et plus particulièrement pour la transmission synaptique entre les fibres cercales et les fibres géantes.

B - ROLE DES IONS Ca^{++} ET Mg^{++}.

1 - Données générales.

Depuis l'étude classique de HARVEY et MAC INTOSH (1940) sur le ganglion cervical supérieur éshériné du Chat, étude ayant ouvert la voie à un grand nombre de travaux, il ne fait plus aucun doute que les ions Ca^{++} sont indispensables à la libération d'ACh par des influx présynaptiques. Citons parmi les principaux travaux ceux de DEL CASTILLO et STARK (1952), de LILEY (1956) à la synapse neuromusculaire de Vertébrés, de BLACKMAN, GINSBORG et RAY (1963) sur les ganglions sympathiques de Grenouille.

Depuis lors, il a été également confirmé que les ions Ca^{++} sont indispensables pour la libération du GABA ou du glutamate à la synapse neuromusculaire du Homard (OTSUKA , IVERSEN, HALL et KRAVITZ , 1966), de l'Escargot et du Crabe (KERKUT, LEAKE, SHAPIRA, COWAN et WALKER, 1965), de l'Ecrevisse (BRACHO et ORKAND, 1970) et aussi de *Periplaneta americana* (KERKUT, LEAKE, SHAPIRA, COWAN et WALKER, 1965) et *Schistocerca gregaria* (USHERWOOD, MACHILI et LEAF, 1968). Il est en outre connu que ces ions exercent une action similaire sur des synapses dont le médiateur est encore inconnu, par exemple à la synapse géante du Calmar (TAKEUCHI et TAKEUCHI, 1962; MILEDI et SLATER , 1966). D'une manière générale, on peut dire avec MILEDI et SLATER (1966) et HUBBARD (1970) que le calcium est nécessaire à la transmission synaptique de type chimique.

En effet, il semble maintenant bien établi que le calcium exerce son action sur les mécanismes amenant la libération du médiateur mais seulement après l'arrivée du potentiel d'action dans les terminaisons nerveuses (KATZ et MILEDI , 1965 et 1967 a). Des études récentes (QUASTEL, HACKETT et COOKE, 1971) restreignent son action entre l'arrivée du potentiel d'action et la mise en jeu du mécanisme de libération du médiateur. Il ne serait donc pas nécessaire pour la libération elle-même. On a suggéré que sous l'action du potentiel d'action, des ions Ca^{++} extracellulaires pénètreraient à l'intérieur des terminaisons où ils seraient impliqués dans une réaction avec

des molécules spécifiques de nature inconnue (X) à la surface interne de la membrane (FATT et KATZ, 1952; HODGKIN, HUXLEY et KATZ, 1949; GORDON et WELSH, 1948 et DEL CASTILLO et KATZ, 1954). Le complexe Ca X servirait alors d'intermédiaire, conduisant à la libération de quanta de médiateur. Une analyse quantitative montre que trois (LANDAU, 1968) ou quatre ions Ca^{++} (DODGE et RAHAMIMOFF, 1967) sont nécessaires à la libération de chaque quantum de médiateur. Cependant, si l'absence de calcium diminue la fréquence des potentiels miniatures elle ne l'abolit pas: ce qui a conduit certains auteurs (HUBBARD, 1961; MAMBRINI et BENOIT, 1964; USHERWOOD, 1963) à considérer qu'une fraction des quanta libérés spontanément est insensible au calcium (environ 30 à 40 %).

En fait l'action du calcium n'est pas limitée à la transmission synaptique. Il semble intervenir dans tous les mécanismes de couplage stimulus-sécrétion, c'est-à-dire d'une manière plus générale, dans les mécanismes de neurosécrétion et de libération des hormones (DOUGLAS, 1968, voir revue par RUBIN, 1970). Il est connu également qu'il joue un rôle important dans l'excitabilité cellulaire, notamment comme stabilisateur (voir revue par KOKETSU, 1969). En particulier, son absence prolongée rend les fibres nerveuses inexcitables, ce qui peut laisser penser que la diminution de médiateur libéré est la conséquence d'une invasion incomplète des terminaisons présynaptiques par le potentiel d'action. Ce n'est cependant pas le cas pour certaines synapses (en particulier à la synapse neuromusculaire de la Grenouille (KATZ et MILEDI, 1965) et à la synapse géante du Calmar (MILEDI et SLATER, 1966) où ces auteurs ont montré que l'influx nerveux continue d'envahir les terminaisons même après le retrait du calcium.

L'ion Mg^{++} qui, à certains égards, peut mimer les effets de l'ion Ca^{++} dans l'excitabilité cellulaire (FRANKENHAEUSER et HODGKIN, 1957; SHANES, 1958; GORDON et WELSH, 1948)a, au contraire, un rôle antagoniste de ce dernier sur la libération d'ACh (BOYD et MARTIN, 1956; DEL CASTILLO et ENGBAEK, 1954; JENKINSON, 1957; HUBBARD, JONES et LANDAU, 1968). Il entrerait en compétition avec l'ion Ca^{++} pour les mêmes sites présynaptiques sans pouvoir favoriser la libération du médiateur. Il a en effet été montré que si les ions Mg^{++}, au même titre que d'autres ions alcalino-terreux (Ca^{++} - Sr^{++} - Ba^{++}), peuvent accroître la libération "spontanée" qui est à l'origine des potentiels miniatures (HUBBARD, 1961; ELMQVIST et FELDMAN,

1965; MILEDI, 1966), seul le système activé par le calcium serait accéléré sous l'action du potentiel d'action présynaptique (HUBBARD, JONES et LANDAU, 1968).

Les ions strontium (Sr^{++}) et baryum (Ba^{++}) sont les seuls qui soient capables de se substituer aux ions Ca^{++} dans le processus de libération du médiateur (ELMQVIST et FELDMAN, 1965, 1966 ; MILEDI, 1966; KATZ et MILEDI, 1969). L'ion manganèse (Mn^{++}) agit par contre comme antagoniste apparemment compétitif de l'ion Ca^{++} dans le processus de libération à la synapse géante du Calmar (KATZ et MILEDI, 1969). Il pourrait par conséquent jouer un rôle analogue à celui de l'ion Mg^{++}. L'ion lanthanum empêche l'entrée de l'ion Ca^{++} dans les terminaisons présynaptiques, soit par compétition soit par dénaturation chimique de la membrane (MILEDI , 1971).

L'ion Na^{+} pourrait également jouer un rôle compétiteur. La diminution de $\left[Na^{+}\right]$ peut augmenter dans une large mesure la libération quantique de l'ACh et accroître ainsi le potentiel postsynaptique à la synapse neuro-musculaire de la Grenouille (BIRKS et COHEN, 1965; KELLY, 1965). Cela se produit malgré la diminution concomitante de l'amplitude du potentiel d'action présynaptique (HODGKIN et KATZ, 1949). On sait en effet que l'amplitude de ce dernier conditionne l'amplitude du potentiel de plaque chez la Grenouille (KATZ et MILEDI, 1967 b) ou du PPSE de la synapse géante du Calmar (TAKEUCHI et TAKEUCHI, 1962). Selon COLOMO et RAHAMIMOFF (1968) il existerait une interaction mutuelle entre les trois ions Ca^{++}, Na^{++} et Mg^{++}. La réduction de $\left[Na^{+}\right]$ augmenterait le nombre de sites disponibles pour le calcium . Tous les auteurs ne sont pas d'accord quant au lieu de compétition des ions Na^{+} et Mg^{++} vis-à-vis des ions Ca^{++}. Pour BIRKS, BURSTYN et FIRTH (1968) ils agiraient au niveau de la même molécule X, tandis que pour GAGE et QUASTEL (1966), les sites d'action seraient différents.

2 - Résultats.

Compte-tenu de ces considérations, il apparaît important d'étudier l'effet de ces ions au niveau du ganglion A_6 de *Periplaneta americana* . Nous nous sommes limités au système le plus classique ; " Ca^{++} - Mg^{++} ".

Il existe en effet très peu de données chez les Insectes sinon encore chez *Periplaneta americana* où ROEDER (1948 c) n'observa que très peu d'effets. La diminution de $\left[Ca^{++}\right]$ déclenchait parfois des décharges anormales enregistrées sur la chaîne tandis que l'augmentation de $\left[Ca^{++}\right]$ n'entraînait aucune modification. Plus récemment, SHANKLAND, ROSE et DONNIGER (1971), ont démontré par enregistrement externe sur la chaîne que la réduction de $\left[Ca^{++}\right]$ de 1,8 à 1 mM et l'adjonction d'ions Mg^{++} (10 mM) bloquent la transmission synaptique dans le ganglion A_6 au bout de 6 à 20 minutes.

a - Action des ions Ca^{++}.

α - Action sur les PPSEs unitaires.

La fig. 66 montre l'action d'un milieu hypercalcique (18 mM) sur des PPSEs unitaires de différentes tailles provenant de l'activité d'un grand nombre de fibres afférentes. Il apparaît clairement que l'amplitude moyenne des PPSEs s'accroît rapidement.

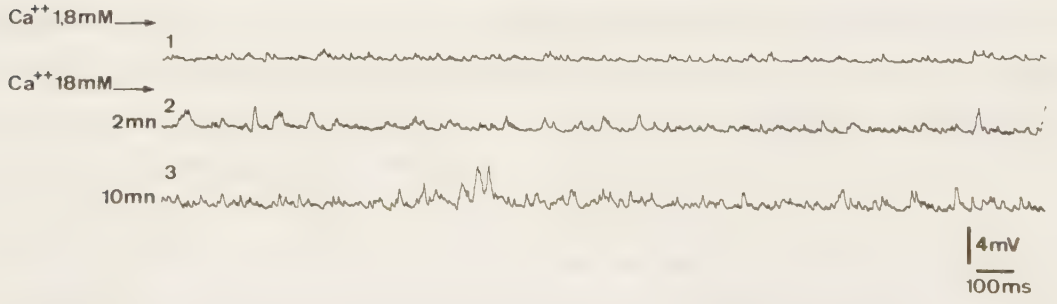


Fig. 66 - Action d'un milieu physiologique hypercalcique sur une activité postsynaptique relativement homogène composée essentiellement de PPSEs unitaires. L'amplitude moyenne augmente en quelques minutes.

Par contre, un milieu hypocalcique (0,18 mM) détermine des effets inverses. L'ensemble des PPSEs diminue progressivement (fig.67); ils peuvent même s'estomper dans le bruit de fond. L'action est ici plus rapide et atteint son maximum en 20 minutes environ. La réversibilité est toujours totale et parfois extrêmement rapide.

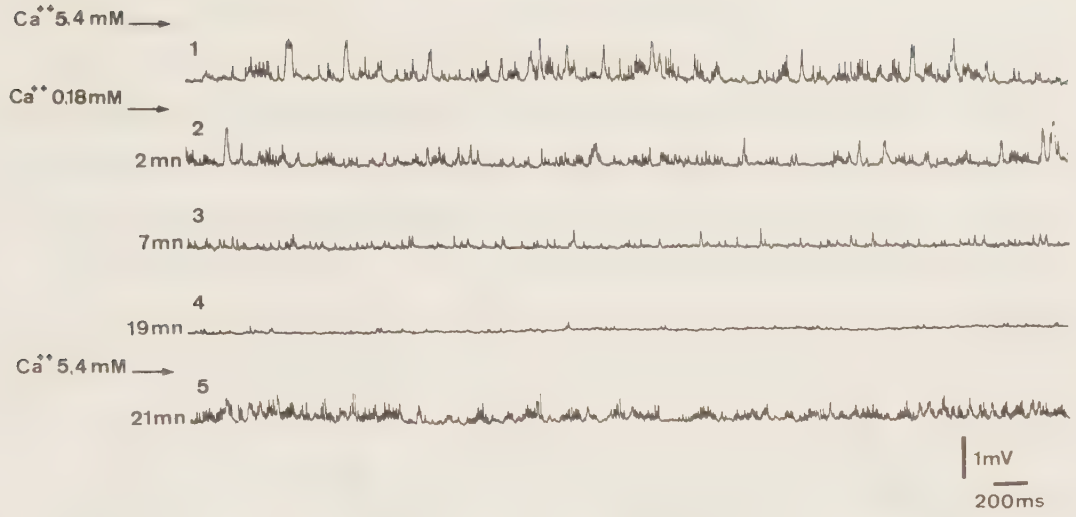


Fig. 67 - Action d'un milieu hypocalcique sur une activité postsynaptique relativement homogène composée essentiellement de PPSEs unitaires.

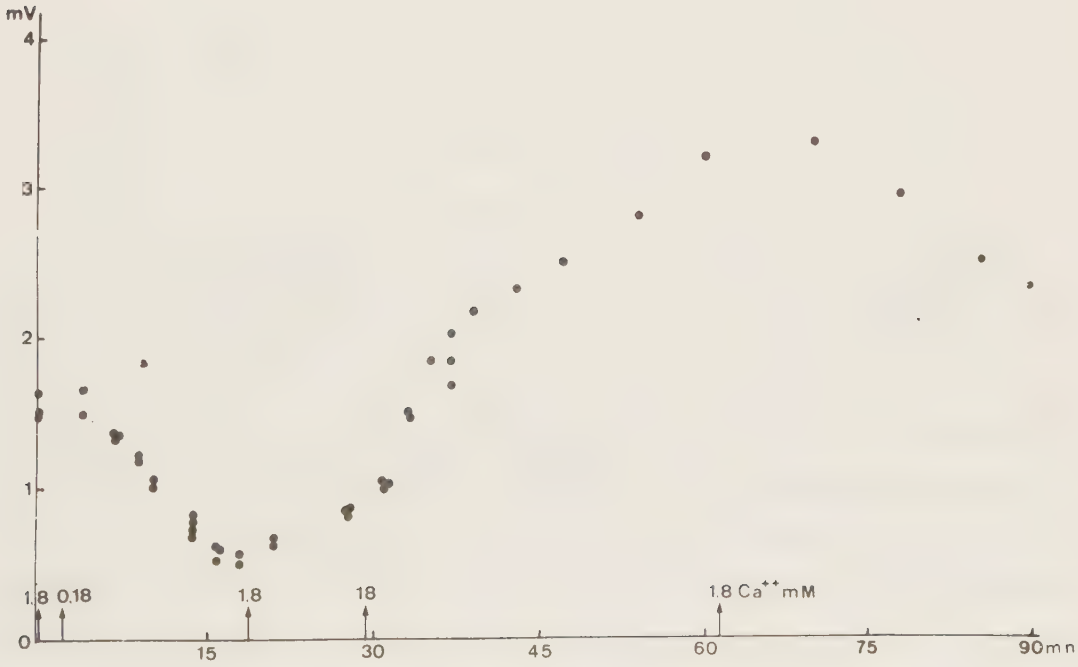


Fig. 68 - Action d'un milieu appauvri (0,18 mM), puis enrichi (18 mM) en calcium sur l'amplitude d'un PPSE unitaire lié à l'activité d'un seul mécanorécepteur cercal.

Cependant, l'expérience précédente ne permet pas de préciser l'action du calcium sur un seul PPSE. Nous avons réalisé dans ce but des expériences sur des PPSEs correspondant à l'activité d'une seule afférence. Sous l'action d'un milieu appauvri (0,18 mM), puis enrichi (18 mM) (fig. 68), le PPSE subit une diminution puis une augmentation très progressive de son amplitude. De tels effets peuvent résulter d'une action aux niveaux pré- ou postsynaptique, et affecter, soit la libération du médiateur, soit l'excitabilité de ces deux éléments, soit une somme d'effets. Par l'application de chocs rectangulaires électrotoniques nous pouvons évaluer les variations de conductance de la fibre postsynaptique. Nous avons observé que lors d'un accroissement de $\left[Ca^{++}\right]$, de telles variations sont pratiquement nulles si la fibre géante est en bon état (voir p. 97). Autrement dit, les effets du calcium sur l'excitabilité cellulaire postsynaptique sont alors vraisemblablement minimes. Cependant, nous avons souvent pu observer une réduction de la résistance membranaire au cours de la diminution de la concentration en calcium, parfois associée à une chute de la constante de temps des PPSEs unitaires. Ces faits tendent à renforcer l'idée que l'influence calcique se situe essentiellement au niveau présynaptique. En outre, si on admet , à la suite des expériences de KATZ et MILEDI (1965) et MILEDI et SLATER (1966), que l'absence d'ions Ca^{++} n'empêche pas le potentiel d'action d'envahir entièrement les terminaisons présynaptiques, l'évolution progressive des PPSEs unitaires permet d'exclure une action importante sur l'excitabilité au niveau présynaptique. Nous pouvons par conséquent attribuer l'action essentielle des ions Ca^{++} à des effets sur les mécanismes de libération du médiateur sans pouvoir aller plus loin dans nos déductions. Ces expériences confirmeraient la nature chimique de la transmission pour toutes les afférences excitatrices monosynaptiques.

β - Action sur le PPSE évoqué.

La fig. 69 représente un exemple de l'action d'un milieu hypercalcique sur le PPSE du nerf XI homolatéral. On observe une augmentation, d'abord rapide et immédiate (les effets se font sentir dès la première minute), qui se poursuit ensuite plus lentement, pour atteindre un plateau au bout de

20 à 45 minutes, selon les préparations. L'effet n'est pas toujours totalement réversible. Les caractéristiques du PPSE (temps de montée et constante de temps) de même que le potentiel cercal électrotonique ne subissent aucun changement notable ce qui permet d'exclure des variations importantes dans les caractéristiques électriques de la membrane postsynaptique.

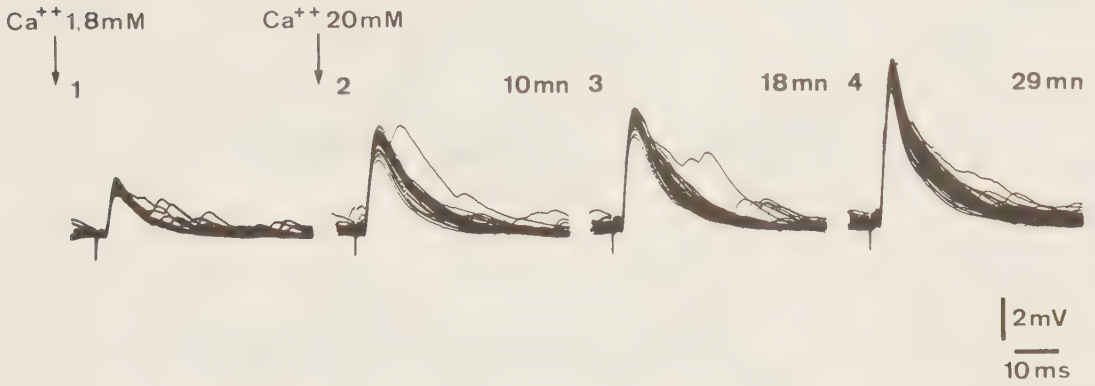


Fig. 69 - Action d'un milieu hypercalcique sur le PPSE évoqué par la stimulation du nerf cercal XI homolatéral. Chaque enregistrement correspond à la superposition de trente stimulations environ (fréquence = 5/s).

Un milieu hypocalcique (fig. 70) entraîne des effets inverses sur ce même PPSE. Nous constatons que son amplitude diminue graduellement sans être accompagnée de modifications sensibles du potentiel cercal électrotonique et que la constante de temps diminue nettement (ce qui a pu être également observé dans certains cas sur les PPSEs unitaires). Ce dernier effet apparaît très rapidement et se termine même avant de noter une diminution importante de l'amplitude. Ainsi on peut penser que l'action du calcium sur la libération du médiateur est relativement plus lente que celle qui affecte les caractéristiques électriques de la membrane postsynaptique.

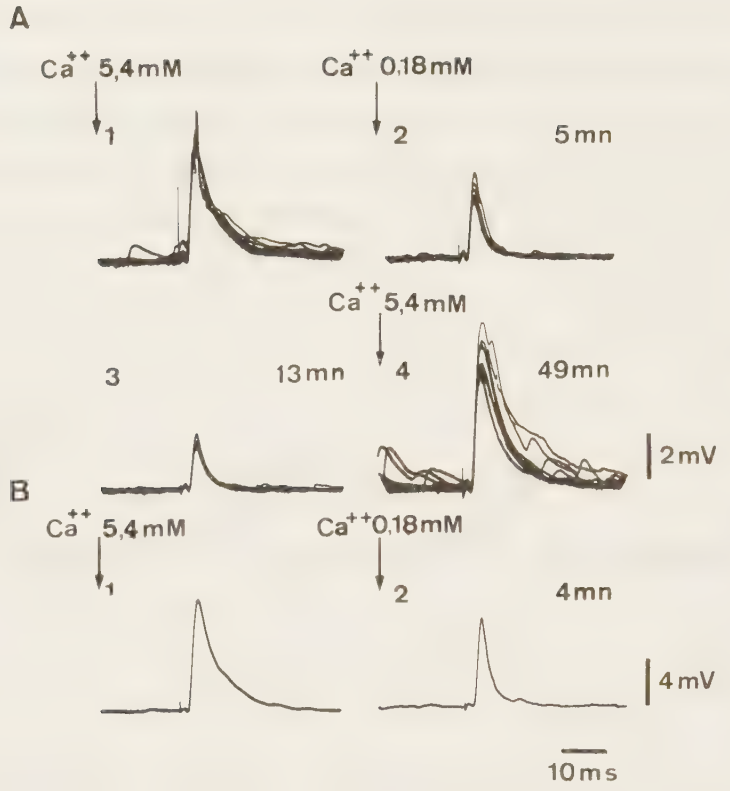


Fig. 70 - Effets d'un milieu hypocalcique sur le PPSE évoqué par la stimulation du nerf cercal XI homolatéral. Noter la diminution de l'amplitude, ainsi que de la constante de temps (enregistrements isolés B_1 et B_2).

Les effets du calcium sur l'amplitude du PPSE dépendent étroitement de la concentration. La fig. 71 traduit l'amplitude finale du PPSE (c'est-à-dire celle atteinte au bout de 45 mn environ) sous l'action de différentes concentrations en calcium. Elle augmente à peu près régulièrement jusqu'à ce que la concentration atteigne environ 18 mM, tandis qu'au-delà, la courbe tend à s'infléchir.

Pour réaliser de telles expériences, la fibre disséquée doit être en parfait état, ce qui peut être vérifié par l'obtention d'un potentiel d'action, si possible de l'ordre de 110 mV. Dans ces excellentes conditions, les effets du calcium sur la fibre géante disséquée sont minimisés. Dans le cas contraire (même lorsque le potentiel d'action est compris entre 90 et 100 mV), le calcium agit avant tout en redonnant vraisemblablement sa stabilité première à la membrane, c'est-à-dire en régulant la perméabilité à certains ions

(en particulier aux ions Na^+ et K^+ d'après KOKETSU, 1969), perméabilité qui aurait été perturbée pendant la dissection. Sur de telles fibres, il a pour effet d'augmenter la résistance membranaire et par voie de conséquence l'amplitude du PPSE . Cette action se superpose à celle qui intéresse la libération du transmetteur.

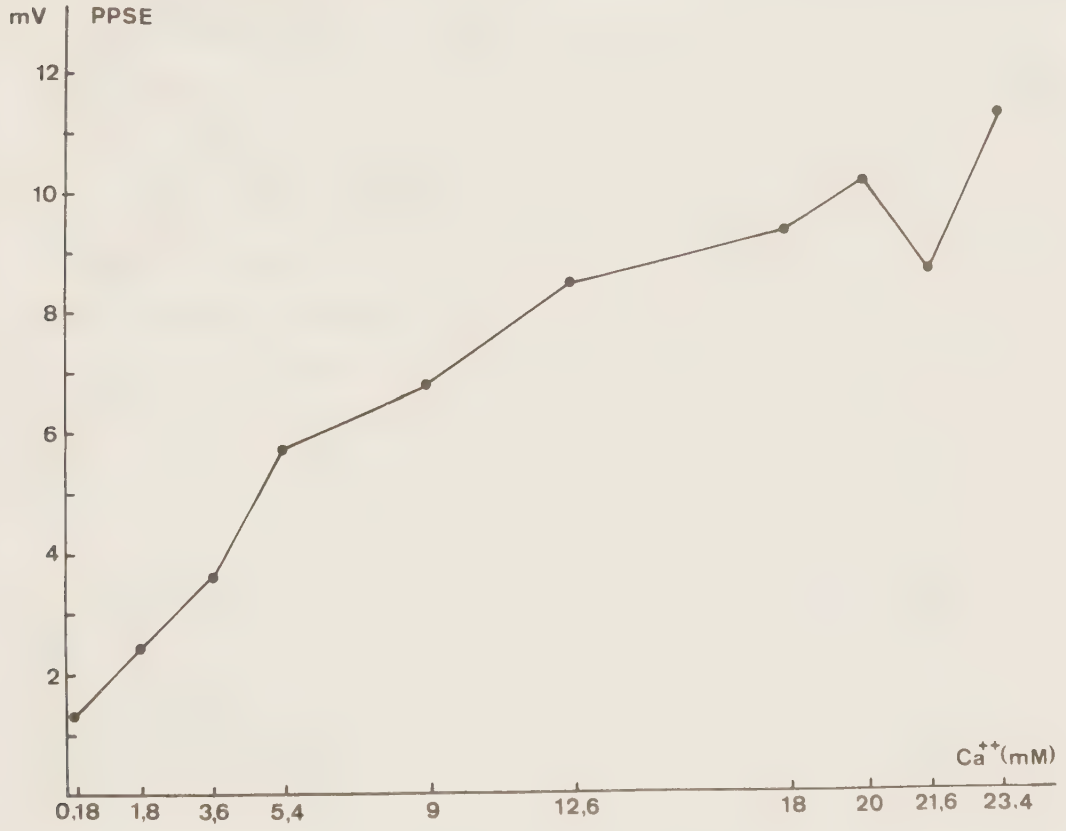


Fig. 71 - Relations entre l'amplitude finale du PPSE évoqué homolatéral et la concentration en calcium (mesures effectuées au bout de 45 mn environ). Chaque point correspond à la moyenne de neuf expériences au moins, sauf les deux derniers points (3 expériences).

Dans toutes les expériences retenues, le calcium n'induisait, soit aucune variation de la résistance membranaire, soit une variation n'excédant pas 10 % (test effectué par des chocs rectangulaires appliqués à la membrane). Lorsque la fibre géante a subi un léger traumatisme au cours de la micro-dissection, nous pouvons opérer en deux temps (nous écartons d'emblée toutes celles qui, à la loupe,paraissent lésées, même légèrement). Nous faisons agir une première fois un milieu enrichi en calcium et nous revenons

au milieu normal; la membrane ainsi traitée retrouve sa stabilité et conserve les qualités acquises. Lors d'une nouvelle action du calcium, elle ne subit pratiquement plus de variations de la résistance membranaire. Cela permet, dans un deuxième temps, d'étudier l'action exclusive de ces ions sur la transmission synaptique.

Ces précautions sont très importantes car elles permettent de préciser que lorsque la préparation est en très bon état, le principal site d'action du calcium n'est pas postsynaptique mais, dans une large mesure, présynaptique. Comme ses effets sur les terminaisons cercales sont apparemment peu importantes (le potentiel cercal électrotonique reste pratiquement invariable), nous pouvons en déduire qu'ils s'exercent essentiellement sur les mécanismes mis en jeu entre l'arrivée du potentiel d'action présynaptique et la libération du médiateur. Nous confirmons par là les données acquises précédemment sur les PPSEs unitaires .

γ- Action sur les PPSIs.

Cette étude est plus délicate à cause d'une interaction possible entre PPSE et PPSI par la stimulation du nerf X (seuils parfois trop voisins). En outre la préparation ne présente pas toujours de PPSIs spontanés en quantité suffisante. Cependant, nous avons pu observer que l'augmentation d'amplitude des PPSIs homo- et contralatéraux (fig. 72) est nette sous l'action des ions Ca^{++}.

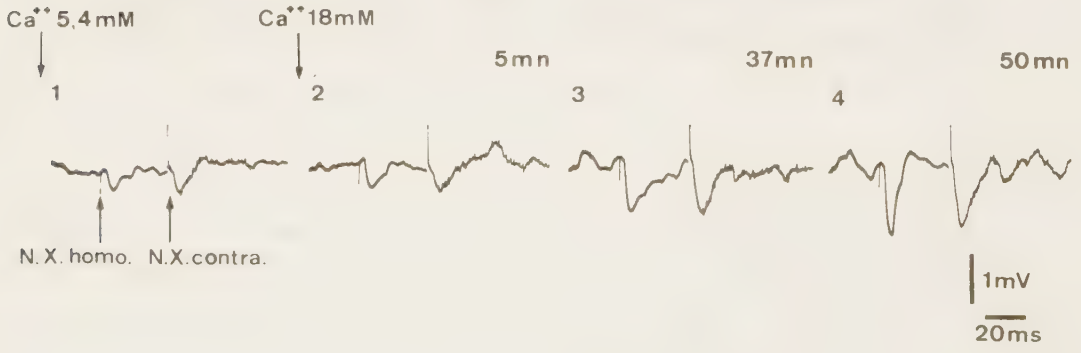


Fig. 72 - Action d'un milieu hypercalcique sur l'amplitude des PPSIs évoqués homo- et contralatéraux.

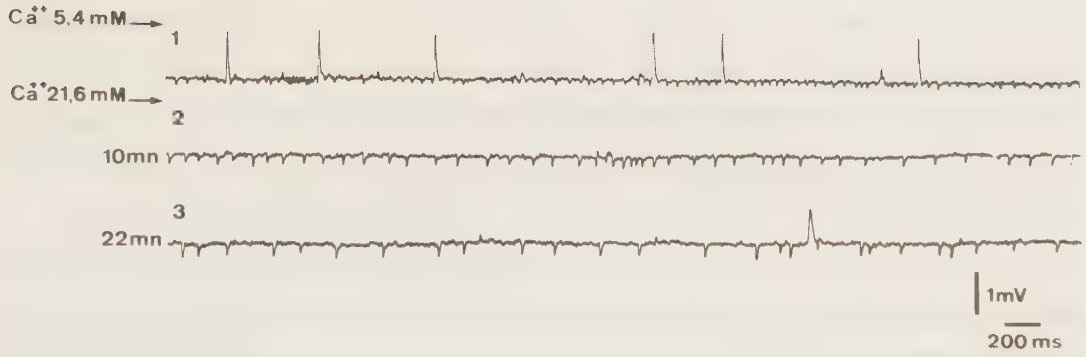


Fig. 73 - Action d'un milieu hypercalcique sur des PPSIs unitaires " spontanés " dus vraisemblablement à l'activation d'un seul neurone présynaptique .

Fig. 74 - Action d'un milieu hypocalcique sur des PPSIs unitaires " spontanés " . Noter la présence de quelques PPSEs unitaires.

Il en est de même pour les PPSIs unitaires (fig. 73). Dans l'exemple choisi, on peut même considérer que les PPSIs unitaires sont liés à peu près tous à l'activité du même interneurone. On peut donc penser que l'accroissement en amplitude se fait progressivement comme pour les PPSEs unitaires. Inversement, un milieu hypocalcique entraîne une diminution progressive des PPSIs unitaires (fig. 74). Il ressort de ces expériences qu'il n'y a pas de différences fondamentales dans l'action du calcium sur les PPSEs et PPSIs, mais qu'il est plus difficile de préciser la localisation du ou des sites d'action.

b - Action des ions Mg^{++}.

α - Action sur les PPSEs .

Pour des concentrations inférieures à 10 mM, les effets sont peu nets et se développent lentement. Entre 10 et 20 mM, le PPSE évoqué diminue progressivement en amplitude (fig. 75) en 20 minutes environ.

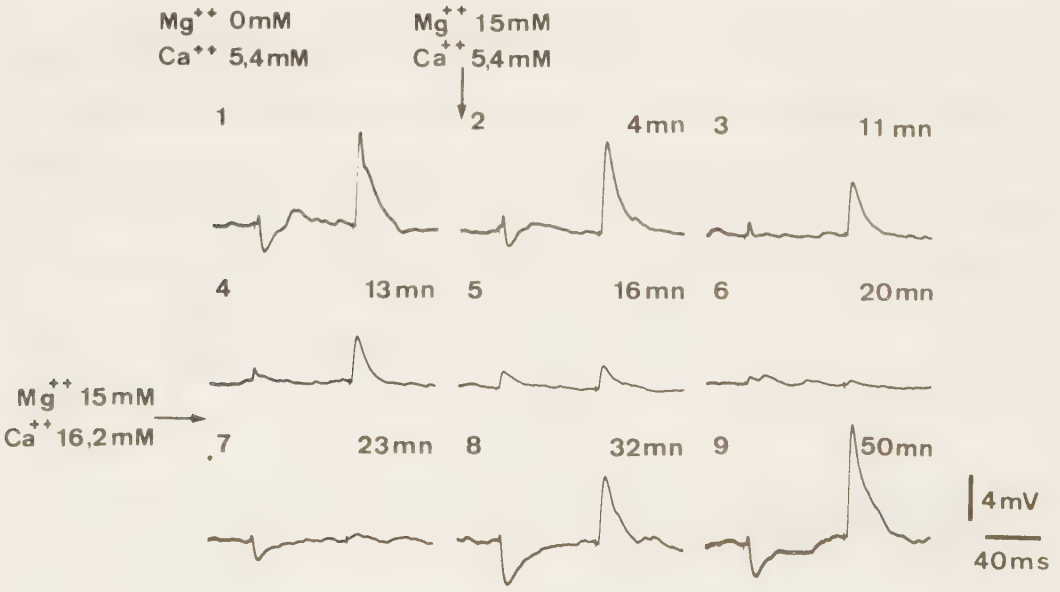


Fig. 75 - Action du magnésium sur les PPSI et PPSE évoqués. Le PPSE diminue régulièrement en amplitude. Le PPSI est précédé d'un petit PPSE monosynaptique. Noter la disparition plus rapide du PPSI qui démasque un PPSE plus ample (photo n°5). L'addition de calcium (16,2 mM) amène la récupération complète. On peut également observer que le PPSI apparaît plus tôt et qu'il passe même par une amplitude plus élevée (photo n°8) que celle de départ.

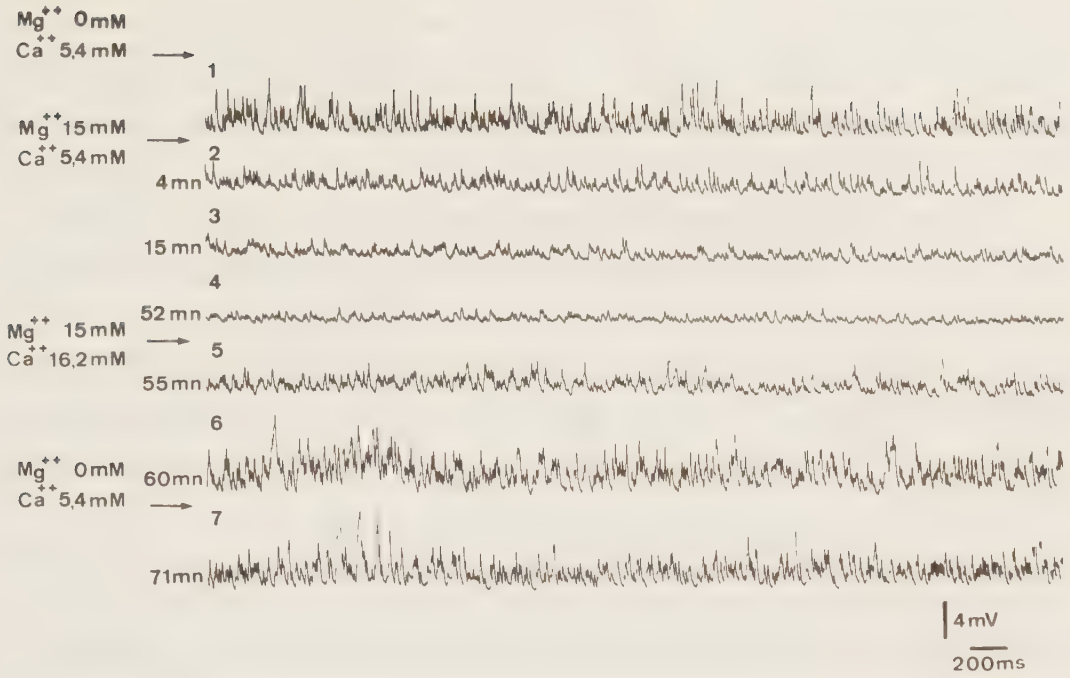


Fig. 76 - Action du magnésium (15mM) sur les PPSEs unitaires (activité postsynaptique relativement homogène). L'addition de calcium (16,2mM) permet la récupération complète en 5 minutes. L'amplitude moyenne obtenue est comparable à celle du milieu normal (tracé n°7).

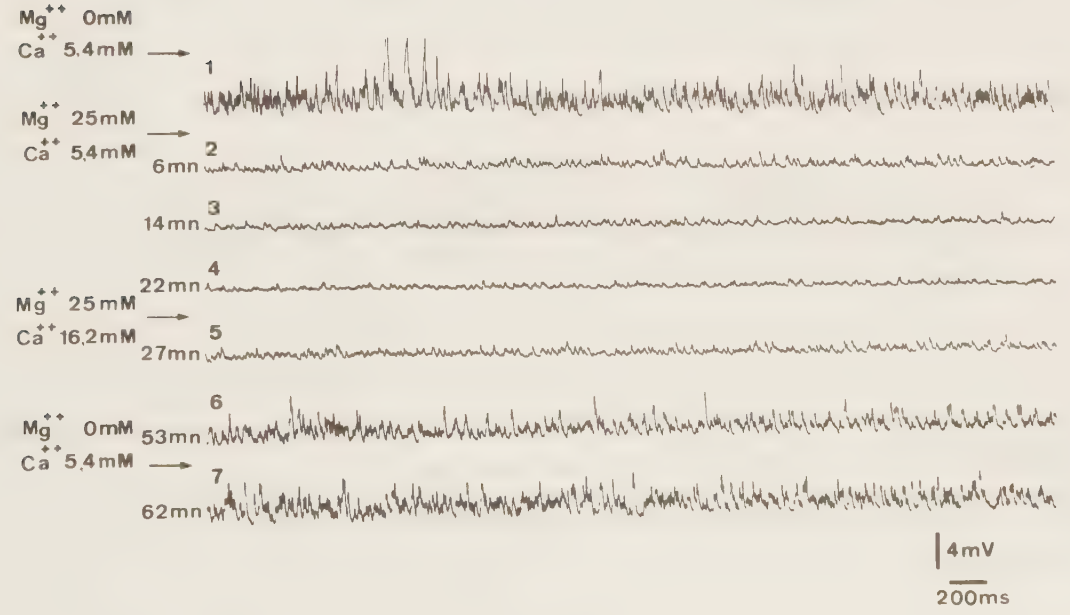


Fig. 77 - Suite de l'expérience illustrée par la fig. 76. Action du magnésium à concentration plus élevée (25mM) sur les PPSEs unitaires. Noter que l'amplitude moyenne est davantage réduite et que l'action est plus rapide. L'addition de calcium (16,2 mM) assure seulement une récupération partielle, même au bout de 26 minutes.

Il ne s'annule pas totalement, sans doute grâce à la présence d'un milieu déjà enrichi en calcium (5,4 mM). La réversibilité de ces effets est totale et peut être acquise, soit par retour au liquide physiologique normal ($\left[Mg^{++}\right]=0$), soit par addition de calcium (fig. 75, $\left[Ca^{++}\right]$ = 16,2 mM).

Les PPSEs unitaires diminuent également de manière graduelle. Les effets sont d'autant plus importants que $\left[Mg^{++}\right]$ est plus élevée. Dans la fig. 76, 15 mM de magnésium réduisent lentement les PPSEs unitaires mais ils conservent environ le quart de leur amplitude initiale même après 52 minutes. La fig. 77, qui représente la suite de l'expérience précédente, démontre que le magnésium plus concentré (25 mM) a une action plus rapide et plus intense.

La fig. 78 illustre l'action des ions Mg^{++} (15 mM) sur les PPSEs unitaires correspondant à un seul récepteur. Il s'agit d'une brève volée phasique dont les PPSEs unitaires constitutifs diminuent progressivement (1).

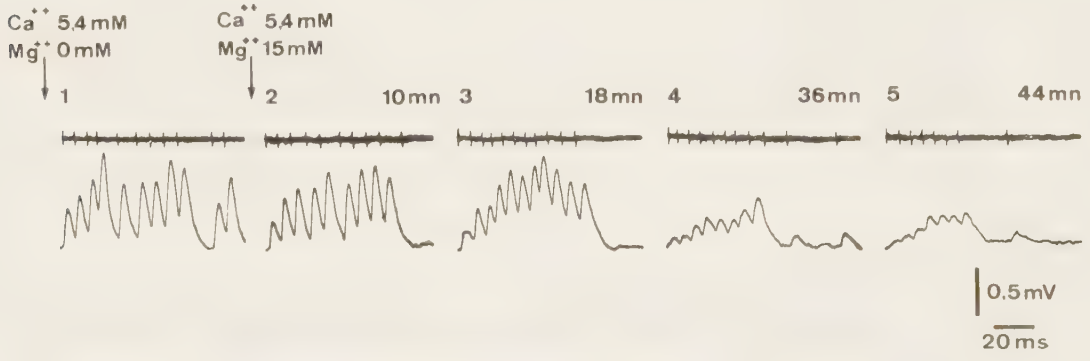


Fig. 78 - Action du magnésium sur l'amplitude de PPSEs unitaires liés à l'activité d'un seul mécanorécepteur phasique. On peut observer un phénomène de facilitation nettement visible au cours de chacune des séquences. Les potentiels d'action présynaptiques sont dérivés sur le nerf cercal XI (tracés du haut) et le premier d'entre eux est utilisé pour déclencher le balayage de l'oscilloscope.

Au cours de ces diverses expériences il est à noter que la résistance membranaire ne subit que peu de variations, ce qui permet de penser, comme pour le calcium, à une action presque exclusive du magnésium au niveau présynaptique.

(1) On peut noter sur cette fig. 78 un phénomène de facilitation: les PPSEs deviennent de plus en plus amples, au cours d'une même séquence (revoir fig.51).

β - Action sur les PPSIs .

L'ion Mg^{++} agit également sur le PPSI dû à la stimulation du nerf X (fig. 75). Le PPSI diminue progressivement, à l'image du PPSE et s'annule en 20 minutes environ. Dans l'expérience décrite, la réponse du nerf X est composite . Sous l'action du magnésium, le PPSI diminue tout d'abord faisant place au PPSE masqué, qui ainsi devient plus apparent malgré sa propre diminution d'amplitude. Cette différenciation peut s'expliquer soit par l'accessibilité plus aisée des zones inhibitrices, soit par une différence spécifique de la membrane des interneurones inhibiteurs (en admettant, bien entendu, une action négligeable sur la membrane de la fibre géante).

L'ion Mg^{++} a très peu d'action sur les PPSIs unitaires. Dans la plupart des cas, nous n'avons pas décelé la moindre diminution d'amplitude, même à une concentration de 25 mM. Dans certains cas isolés, les PPSIs subissent quelques variations, apparemment liées à des perturbations de la fibre géante elle-même et provenant sans doute de la microdissection.

Les effets dépresseurs dus au magnésium peuvent être contrebalancés par l'addition simultanée de calcium (16,2 mM). Les PPSEs et les PPSIs évoqués (fig. 75) ainsi que les PPSEs unitaires (fig. 76 et 77) réapparaissent rapidement et d'autant plus vite que la concentration initiale en magnésium est moins élevée (fig. 76 et 77). Ainsi, des concentrations à peu près égales en calcium et en magnésium (15 et 16,2 mM) ont des effets qui s'équilibrent, ce qui n'entraîne pas de grandes différences par rapport au Ringer normal ($\left[Ca^{++}\right]$ = 5,4 mM) (fig. 76, 6 et 7). La fig. 75 (photo n°8) montre que pendant la phase de restauration par le calcium, après dépression par le magnésium, le PPSI passe par une amplitude plus grande que celle du départ. Cette observation peut s'expliquer comme précédemment pour le magnésium, par une accessibilité des ions Ca^{++} aux sites inhibiteurs plus aisée que pour les sites excitateurs.

3 - Discussion

a - Action des ions Ca^{++}.

Les mécanismes fins de l'action du calcium sur la transmission synaptique ont été essentiellement dégagés à partir d'expériences réalisées à la synapse neuromusculaire (voir p. 209). Cet élément s'est révélé également indispensable au niveau du SNC, où cependant les études restent relativement peu nombreuses. Elles concernent essentiellement la synapse géante du Calmar (TAKEUCHI et TAKEUCHI, 1962; MILEDI et SLATER, 1966; KATZ et MILEDI, 1969; KUSANO, 1970), les ganglions sympathiques (HARVEY et MAC INTOSH, 1940; HUTTER et KOSTIAL, 1954), des cellules ganglionnaires d' *Onchidium* (KUSANO et HAGIWARA, 1961) ou d'Aplysie (TAUC, EPSTEIN et MALLART, 1965), des motoneurones spinaux de la Grenouille (KATZ et MILEDI, 1963), le ganglion ciliaire du Poulet (MARTIN et PILAR, 1964) ou le cerveau de Mammifères (RANDIC et PADJEN, 1967; HEMSWORTH et MITCHELL, 1969). Tous ces travaux sont relatifs à l'action du calcium sur le PPSE; par contre ils sont rares en ce qui concerne les PPSIs (OTSUKA, IVERSEN, HALL et KRAVITZ, 1966).

Nos expériences, réalisées sur le ganglion A_6 de *Periplaneta americana*, démontrent que le calcium est vraisemblablement un élément nécessaire à la transmission synaptique de type neuro-neuronique chez un Insecte, et cela aussi bien pour les influences excitatrices qu'inhibitrices. De ce point de vue, notre préparation se comporte comme tous les cas connus de synapses chimiques. Cependant, il est difficile de dégager l'action spécifique de cet élément sur la transmission synaptique car le calcium agit en effet, à plusieurs niveaux. Il est reconnu que de nombreux tissus excitables ont besoin de sa présence dans le milieu extérieur pour maintenir leur excitabilité normale . En particulier, chez *Periplaneta americana* , si on augmente la concentration en ions Ca^{++} de 1,8 mM à 18 mM, la membrane de l'axone géant s'hyperpolarise de 3 mV (NARAHASHI, 1963). L'hypocalcémie entraîne des effets inverses qui peuvent même aller jusqu'au blocage de la conduction si on supprime totalement les ions Ca^{++}.

Ces différents faits montrent clairement que le calcium exerce un double rôle, ce qui rejoint le cas de nombreux autres animaux (voir KOKETSU , 1969). D'une part il régule le potentiel de membrane et d'autre part il facilite indirectement la libération du médiateur chimique.

b - Action des ions Mg^{++}.

Nos expériences révèlent également que le magnésium a un effet dépresseur sur la transmission sans que l'on puisse affirmer s'il entre effectivement en compétition avec le calcium pour les mêmes sites. Elles rejoignent ainsi les études qui ont montré que le potentiel postsynaptique décroît, aussi bien à la synapse neuromusculaire (DEL CASTILLO et KATZ, 1954; JENKINSON, 1957; HUBBARD, JONES et LANDAU, 1968),que dans le SNC, notamment sur des structures ganglionnaires telles que des cellules d'Aplysie (TAUC, EPSTEIN et MALLART, 1965), le ganglion ciliaire de Poulet (MARTIN et PILAR, 1964), les ganglions sympathiques de Mammifère (HUTTER et KOSTIAL, 1954) ou d'Amphibien (BLACKMAN, GINSBORG et RAY, 1963) et la synapse géante du Calmar (KUSANO, 1970).

A notre connaissance, l'action du magnésium sur les PPSIs est peu ou pas connue. Nous avons observé que les PPSIs unitaires ne subissent aucune variation notable sous l'action des ions Mg^{++}, mais que par contre les PPSIs évoqués par la stimulation électrique des nerfs X diminuent et s'annulent rapidement, plus rapidement même que les PPSEs. Ces faits apparemment contradictoires peuvent s'expliquer;

1° - par la présence de mécanismes fondamentalement différents pour les PPSIs unitaires " spontanés " et les PPSIs déclenchés électriquement.

2° - ou bien par une action du magnésium qui se situerait uniquement aux terminaisons présynaptiques du protoneurone. Cette dernière explication cadrerait bien avec l'hypothèse d'un relais disynaptique que nous avons développée p. 149 . On peut en outre concevoir que le premier neurone serait excitateur et libérerait un médiateur différent de celui libéré aux terminaisons inhibitrices.

En conclusion, par analogie avec ce qui ce passe pour d'autres synapses et notamment à la synapse neuromusculaire, nous pouvons émettre

l'hypothèse que la dépression observée par un accroissement du rapport $\frac{Mg^{++}}{Ca^{++}}$ est due, dans une large mesure, à la diminution de la quantité de médiateur libéré. Il semble bien que le magnésium n'intervienne pas dans les mécanismes qui sont à l'origine des PPSIs unitaires, autrement dit sur les synapses inhibitrices, ce qui , peut- être, constitue un argument en faveur de l'intervention d'un médiateur différent.

c - Rôle des ions Ca^{++} et Mg^{++} dans le ganglion entier .

Les expériences que nous venons d'évoquer démontrent incontestablement le rôle important joué par les ions Ca^{++} et Mg^{++} dans la transmission synaptique. Néanmoins,le liquide physiologique " normal " utilisé par la plupart des auteurs chez la Blatte, ne contient que 1,8 mM de calcium et pas de magnésium.

Une question se pose : ce milieu est-il convenablement adapté pour assurer, dans les meilleures conditions, la transmission synaptique et l'excitabilité cellulaire ? Pour répondre à cette question, il est bon de rappeler les données que l'on possède sur la concentration de ces différents ions dans divers compartiments. Dans l'hémolymphe de *Periplaneta americana*, il existe par exemple une assez grande quantité de calcium (4,35 mM) et de magnésium (5,6 mM)(données évaluées par VAN ASPEREN et VAN ESCH, 1956). Selon TREHERNE (1962), les ions Ca^{++} sont en concentration très élevée (17,6 mM) dans les espaces extracellulaires de la chaîne nerveuse du même Insecte. PICHON (thèse, 1969) estime que le magnésium , bien que la concentration n'ait pas été évaluée, serait également présent en grande quantité, dans ces mêmes espaces. Cet auteur a mis en relief les divers comportements de la portion axonique des fibres géantes, avec ou sans gaine, dans différents milieux (Ringer physiologique dit " normal ", Ringer extracellulaire se rapprochant de la composition des espaces extraaxoniques intraganglionnaires et hémolymphe). Il ressort de ces travaux que le microenvironnement qui se trouve au contact direct des fibres possède une concentration relativement élevée en ions K^{+} (17,1 mM), ce qui a pour effet de les dépolariser d'une dizaine de mV. Comme nous venons de le dire plus haut, il contient en outre beaucoup de calcium ainsi vraisemblablement que de magnésium, ions qui auraient pour effet, selon PICHON, de stabiliser la membrane et de lui

assurer une excitabilité normale en dépit de la faible polarisation de celle-ci (- 58,1 mV). La richesse en sodium extracellulaire (169 mM par TOBIAS, 1948) aurait pour conséquence d'engendrer un potentiel d'action ample (103 mV) ce qui constituerait un excellent facteur de sécurité. Il apparaît au travers de ces diverses données que les éléments nerveux de *Periplaneta americana* ne peuvent fonctionner normalement que sous des concentrations élevées en ions divalents tels que Ca^{++} et Mg^{++}. Il est en outre concevable d'admettre que de telles concentrations ne sont pas sans incidence sur la transmission synaptique, ce qui nous amène à conclure que le milieu physiologique traditionnellement utilisé ne contient certainement pas assez de calcium et qu'il serait sans doute bon de lui adjoindre du magnésium.

Que se passe-t-il lorsque la gaine ganglionnaire est incisée ? La gaine aurait un rôle dans la répartition des ions entre les espaces extracellulaires et la solution externe, qui s'effectuerait selon un équilibre de Donnan (TREHERNE, 1962). La résection de la gaine pourrait plus ou moins détruire l'équilibre local au niveau des éléments nerveux intraganglionnaires, en élargissant par exemple les espaces extracellulaires et en favorisant la fuite de certains ions. Par exemple, selon TREHERNE (1962), la concentration en calcium chuterait de 17,6 à 4,6 mM, valeur voisine de celle de l'hémolymphe. Dans ces conditions, il n'est pas douteux que l'excitabilité des éléments nerveux soit perturbée, notamment au cours de la microdissection des fibres géantes qui nécessite la résection de la gaine des connectifs, ainsi que lors des expériences pharmacologiques (voir plus loin) qui nécessite en outre l'incision de la gaine ganglionnaire. Pour ces diverses raisons nous pensons qu'il serait souhaitable d'utiliser un liquide physiologique se rapprochant d'un type " extracellulaire ".

C - CONCLUSION .

A la suite de ce chapitre où nous avons particulièrement mis en relief l'importance que peuvent avoir certains facteurs, et notamment l'oxygène et le calcium, une question vient immédiatement à l'esprit : l'environnement optimal que nous avons tenté de cerner correspond-il à celui qui existe réellement in vivo ? Il est évidemment impossible de répondre à cette question. Il n'y a en effet aucun moyen de faire in vivo une analyse de l'activité synaptique aussi fine que celle que nous avons pu faire grâce à la technique de l'oil-gap et par là il n'y a aucun élément de comparaison. Il serait concevable d'introduire une microélectrode en position intracellulaire dans le ganglion laissé en place. Cependant il est quasi obligatoire d'inciser la gaine ganglionnaire pour livrer passage à la microélectrode. Nous avons rappelé combien cette opération perturbe l'équilibre qui peut exister entre les milieux extracellulaires et l'hémolymphe . Par conséquent,l'étude de la préparation in situ ou in vitro nécessite l'incision de la gaine. La technique de l'oil-gap permet certaines études avec le ganglion intact. Même dans ce cas, l'intérieur se trouve en contact avec le milieu extérieur par le connectif sectionné à l'endroit de la fibre isolée.

A défaut de pouvoir répondre avec précision à la question posée plus haut, nous pouvons cependant concevoir que la concentration importante en cations divalents (Ca^{++} et Mg^{++}) dans les milieux extracellulaires se répercute dans une large mesure sur la transmission synaptique.

En outre,nous avons supposé l'existence de pompes métaboliques dont le rôle est apparemment très important dans le maintien du potentiel de membrane et des bonnes conditions de transmission. Cependant,le manque d'informations sur la richesse en phosphates à haute énergie, sur la concentration en glucose, sur l'exact besoin en oxygène ne nous permet pas d'évaluer l'intensité de leur fonctionnement dans le ganglion A_6, et par là même, de la valeur réelle du potentiel de membrane.

Les conditions optimales que nous avons dégagées sont par conséquent relativement empiriques. Elles ne nous permettent pas d'établir des

comparaisons sur des valeurs absolues, mais sur des valeurs relatives. Ce qui nous paraît important est avant tout en rapport avec la durée de survie de la préparation isolée et la constance des principaux paramètres, dont la polarisation et la résistance membranaires postsynaptiques. Un autre facteur n'est certainement pas à négliger ; il s'agit des besoins énergétiques nécessaires au métabolisme des médiateurs chimiques dont nous avons supposés l'existence. Là encore, nous n'avons aucune idée réelle sur la quantité de tels besoins.

La connaissance précise du microenvironnement synaptique, si elle est importante, n'est cependant pas indispensable pour l'étude de certains phénomènes, et notamment l'étude des afférences en rapport avec une fibre géante donnée et des relations entre les divers types de messages sensoriels et leurs effets postsynaptiques. L'inconnue majeure concerne le niveau exact de dépolarisation à partir duquel la fibre postsynaptique engendre un influx propagé.

Chapitre IV

Aspects pharmacologiques de la transmission synaptique.

A - L'ACETYLCHOLINE (ACh) EST-ELLE MEDIATEUR CHIMIQUE CHEZ LA BLATTE ?

A l'issue de la première partie de ce mémoire, nous avons regroupé les données déjà acquises et qui peuvent être retenues comme critères en faveur de l'identification de l'ACh en tant que neurotransmetteur au niveau du ganglion A_6, entre les afférences cercales et les fibres géantes.

Il nous est clairement apparu que, faute de pouvoir accéder facilement, à l'aide des techniques classiques, aux régions synaptiques neuropilaires, les critères électrophysiologiques ne possèdent pas la précision souhaitée et ne permettent pas, en particulier, une analyse directe et intime des phénomènes à l'échelon membranaire. Ainsi, notamment les critères d'identité d'actions physiologiques (critères 5 et 6 de GERSCHENFELD, 1966 ; 7 et 8 de WERMAN, 1966) restent très insuffisants. En tenant compte des avantages particuliers que nous offre la technique " oil-gap - fibre isolée " (contrôle postsynaptique du potentiel et de la résistance membranaires), nous avons tenté de combler en partie ces lacunes.

Dans ce but, nous avons envisagé les expériences principales suivantes:

- action de l'ACh appliquée sur le ganglion entier ou par ionophorèse sur la membrane postsynaptique des fibres géantes;

- action de deux substances agonistes : la nicotine et l'acétyl - β - méthylcholine;

- action de deux substances antagonistes : le curare et l'atropine;

- action d'une substance inactivatrice du système enzymatique hydrolyseur : l'ésérine.

Dans tous les cas, nous comparerons les effets sur le potentiel " artificiel " (potentiel d'ACh) et sur les divers potentiels " naturels " liés à l'activation des afférences cercales. Nous essayerons de voir dans quelle mesure il y a identité d'action de certaines de ces substances sur les deux types de potentiels.

Mais tout d'abord nous allons rassembler quelques données générales dans le but de faire le point sur les connaissances actuelles.

1 - Quelques données sur la structure de l'ACh, d'agonistes, d'antagonistes et de cholinorécepteurs.

a - ACh, agonistes et cholinocepteurs.

Depuis les expériences de DALE (1914), il est classique de dire que les actions pharmacologiques de l'ACh peuvent être divisées, en dehors du SNC, en deux types principaux, nicotinique et muscarinique , chacun d'eux étant défini par les effets de substances agonistes et antagonistes basées sur les activités de la nicotine et de la muscarine. Les sites nicotiniques sont prédominants à la synapse neuromusculaire tandis que les sites muscariniques sont surtout présents dans les organes cibles parasympathiques. Certains auteurs ont utilisé cette classification au niveau du SNC et ont même pu décrire ces deux types de sites (ANDERSEN et CURTIS, 1964 a et b; CURTIS et RYALL, 1964).

Il était logique d'admettre que toutes les substances appartenant au système cholinergique présentent des traits structuraux communs détectables par l'analyse de la configuration moléculaire. De nombreuses théories ont ainsi tenté de dégager les bases permettant :

1° de différencier les substances agonistes et antagonistes et

2° de séparer, à l'échelon moléculaire, les séries nicotinique et

muscarinique (CHOTHIA, 1970; BEERS et REICH, 1970; SHEFTER et TRIGGLE, 1970; BAKER, CHOTHIA, PAULING et PETCHER, 1971).

La molécule d'ACh, $(CH_3)_3N^+ CH_2 CH_2 O (CO) CH_3$, est flexible et présente plusieurs configurations stables différant par la valeur de certains angles de torsion (BAKER, CHOTHIA, PAULING et PETCHER, 1971). Les seuls groupes atomiques qui semblent pouvoir entrer en interaction avec le récepteur cholinergique sont: le groupe quaternaire cationique $(CH_3)^3 N^+$ par des forces électrostatiques, et le groupe méthyle (C_7) ou carbonyle (O_2) par des forces de Van der Waals (PAULING et PETCHER, 1970). Selon CHOTHIA (1970), le groupe méthyle associé au groupe quaternaire constitue la structure essentielle des agonistes nicotiniques et le groupe carbonyle associé au groupe quaternaire celle des agonistes muscariniques. BEERS et REICH (1970) ont proposé d'autres variantes mais sont également d'accord pour différencier les deux séries nicotinique et muscarinique par le groupe quaternaire et certains sites moléculaires faisant intervenir une liaison hydrogène sur les oxygènes accepteurs O_1 (muscarinique) ou O_2 (nicotinique). La nicotine d'une part, la muscarine (extraite de l' *Amanita muscaria*) et l'acétyl- β - méthylcholine d'autre part peuvent être considérées comme des substances agonistes type, respectivement des séries nicotinique et muscarinique tandis que la d-tubocurarine et l'atropine sont les principales drogues antagonistes respectivement des séries nicotinique et muscarinique.

Selon un travail récent (SAKORE, TAVALE et SOBELL, cités par BEERS et REICH, 1971) la molécule de d-tubocurarine contient plusieurs atomes d'oxygène et sa structure cristalline indique que deux d'entre eux peuvent servir d'accepteurs de liaison hydrogène à des positions stéréochimiquement compatibles avec celles proposées pour d'autres agents nicotiniques. Selon deux sources différentes (PAULING et PETCHER, 1970; BEERS et REICH, 1971) l'atropine se fixerait sur le récepteur par des liaisons compatibles avec celles de la série muscarinique.

Les critères permettant de distinguer des substances antagonistes et agonistes de l'ACh, sont, d'après PAULING et PETCHER (1970), la présence d'un groupe lipophile capable de développer des forces de Van der Waals plus fortes qu'un groupe méthyle lorsqu'ils sont placés à égale distance d'un atome d'azote chargé électriquement, et la présence d'un groupe électrophile OH

(dans le cas de l'atropine) en relation spatiale convenable par rapport aux deux premiers groupes. Ces diverses molécules (agonistes ou antagonistes) se fixent d'une part sur un site anionique de la protéine réceptrice par le groupe cationique quaternaire (CH_3) 3 N^+ et d'autre part par un deuxième site, variable selon les substances et les récepteurs. C'est donc la qualité de ce deuxième site qui est essentiellement à l'origine de la spécificité de chacune des molécules agonistes ou antagonistes.

b - Curare et atropine : données actuelles sur les sites d'action de ces deux substances antagonistes de l'ACh.

Si le curare (d-Tubocurarine = dTC) est certainement l'une des substances les plus utilisées en pharmacologie, c'est aussi une de celles ayant amené le plus de controverses quant à son ou ses sites d'actions. Nous pensons qu'il serait utile d'essayer de faire le point sur la question. Cette drogue a surtout été étudiée à la jonction neuromusculaire où il semble plus ou moins bien établi que son action principale résulte d'un blocage des récepteurs cholinergiques. Cependant,de nombreux auteurs estiment que la drogue peut avoir quelques effets sur les nerfs et qu'une part du blocage neuromusculaire résulterait d'une action sur la libération du médiateur (BEANI, BIANCHI et LEDDA, 1964; HUBBARD, WILSON et MIYAMOTO, 1969).

En fait, les effets observés sont plus ou moins liés à la technique utilisée. La première méthode est semi-directe dans la mesure où la réponse est enregistrée par microélectrode intracellulaire au niveau de la plaque motrice ce qui, selon l'hypothèse quantique de la libération du médiateur, permet d'estimer indirectement, par analyse statistique, la quantité libérée. Ces expériences ont été pratiquées sur muscles paralysés (excès d'ions Mg^{++} et déficience en ions Ca^{++}, par exemple), et dans ces conditions, le curare agit sur la sensibilité de la membrane postsynaptique sans affecter le contenu quantique du potentiel postsynaptique (FATT et KATZ, 1952;JENKINSON, 1960; KATZ, 1969). D'autres auteurs ont utilisé des méthodes indirectes, in vivo et sur des muscles non préalablement paralysés (HUBBARD et SCHMIDT, 1961, 1963; STANDAERT, 1964; RIKER, 1966; RIKER et OKAMOTO, 1969). Ils considèrent que le principal effet du curare est présynaptique car cette drogue

déprime l'activité répétitive antidromique des racines ventrales de la moëlle des Vertébrés, activité induite par exemple après action de substances anti- ChE . La question a été reprise récemment en utilisant la méthode directe tout en évitant de paralyser le muscle (HUBBARD, WILSON et MIYAMOTO, 1969; AUERBACH et BETZ, 1971; GALINDO, 1971).

De ces travaux, il ressort que le curare aurait une action présynaptique à la synapse neuromusculaire, et que les effets diffèrent selon certains détails techniques utilisés, sur lesquels nous ne nous étendrons pas. Cependant, GALINDO (1971) a pu préciser que pour de faibles concentrations (inférieures à 10^{-8} g/ml), les effets du curare sont essentiellement présynaptiques (diminution de la fréquence des potentiels miniatures plus importante que la diminution relative d'amplitude, augmentation de la période réfractaire absolue, diminution de la vitesse de mobilisation du médiateur et accroissement de la probabilité de libération quantique), la dépression étant d'autant plus nette que la fréquence de stimulation est plus élevée. Les effets postsynaptiques (testés sur des potentiels d'ACh obtenus par injection ionophorétique) ne sont visibles que pour des doses supérieures à 10^{-6} g/ml. Il résulte de ces expériences que, outre les effets présynaptiques, le curare agit bien postsynaptiquement, mais à des concentrations plus élevées.

Selon HUBBARD et WILSON (1970), l'atropine a, comme le curare, des effets pré- et postsynaptiques. Les effets présynaptiques seraient , selon leurs estimations, cent fois moins importants que ceux du curare.

Des expériences récentes tendent à renforcer l'idée que dans ses effets postsynaptiques, le curare a une action spécifique sur les récepteurs cholinergiques. Une toxine extraite d'un venin de serpent, l' α-bungarotoxine (α-Bgt), polypeptide basique de poids moléculaire voisin de 8000, a été étudiée de manière intensive par LEE et ses Collaborateurs (CHANG et LEE, 1963 ; LEE et CHANG, 1966; LEE, TSENG et CHIU, 1967). L' α - Bgt bloque irréversiblement la synapse neuromusculaire et ses effets sont plus prononcés que ceux du curare. D'autre part , le curare protège la synapse contre l'action de l' α- Bgt (LEE et CHANG, 1966). L' α- Bgt a été reprise récemment par CHANGEUX, KASAI et LEE (1970) sur diverses prépara -

tions dérivées de l'organe électrique du Gymnote *Electrophorus electricus* (1). Ils ont montré que cette toxine possède des effets spécifiques sur le site récepteur cholinergique de la protéine réceptrice et confirmé que le curare (dTC) à la concentration de 10^{-5}M protège la molécule réceptrice contre les effets de l' α-Bgt. Ils en déduisent que le curare a bien également un effet de blocage spécifique sur la même macromolécule réceptrice cholinergique (2).

Ces diverses expériences effectuées, soit à la synapse neuromusculaire, soit sur l'organe électrique du Gymnote, permettent de synthétiser les effets du curare comme suit :

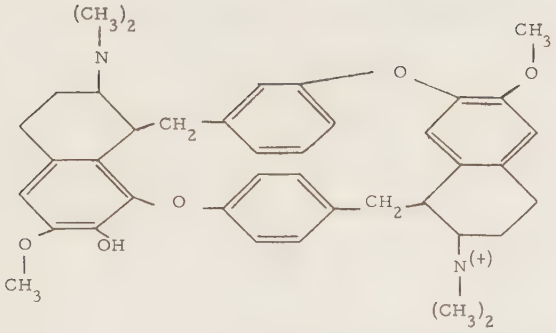
- pour des concentrations relativement faibles (inférieures à 10^{-8}g/ml), les effets sont localisés essentiellement aux terminaisons présynaptiques;
- pour des concentrations plus élevées (supérieures à 10^{-6}g/ml), des effets postsynaptiques importants se superposent aux effets présynaptiques et s'expliquent par une fixation sur la protéine réceptrice cholinergique. Le curare a par conséquent un rôle compétiteur vis-à-vis de l'ACh pour les mêmes sites ou des sites extrêmement voisins de cette macromolécule. Cela est encore renforcé par le fait que les configurations moléculaires de l'ACh et du curare ont des points communs.

L'atropine possèderait également ces deux sites d'action (pré- et postsynaptiques) mais serait cent fois moins active que le curare au niveau présynaptique (HUBBARD et WILSON, 1970).

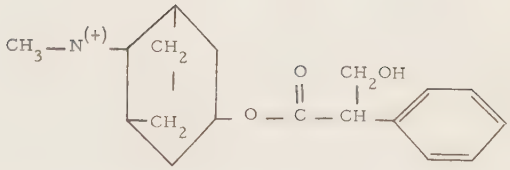
Il est regrettable que de telles études n'aient pu être effectuées sur le SNC.Nous retiendrons cependant, par pure analogie, ces divers traits de comportement du curare et de l'atropine pour tenter d'expliquer les effets que nous avons observés sur les PPSEs et les potentiels dus à l'injection d'ACh (voir résultats).

(1) D'autres auteurs ont pu, grâce à cette toxine, isoler un récepteur cholinergique chez *Torpedo marmorata* (MILEDI, MOLINOFF et POTTER, 1971). Une autre toxine (toxine α de *Naja nigricollis*) aurait des propriétés identiques à celle de α - Bgt (BOQUET, IZARD, JOUANNET et MEAUME, 1966; MEUNIER et Coll., 1971). Par des techniques différentes, il a été possible d'isoler des molécules protéolipidiques, ayant des propriétés de récepteurs cholinergiques (voir DE ROBERTIS, 1971).

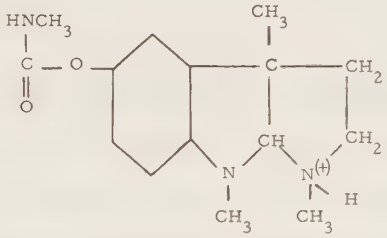
(2) Certains auteurs n'accordent pas cependant une telle spécificité au curare et à l'atropine.Le curare pourrait également bloquer des sites sérotonergiques (STEFANI et GERSCHENFELD, 1969) et dopaminergiques (ASCHER cité par STINNAKRE, 1970) et l'atropine, des sites sérotonergiques (GERSCHENFELD et STEFANI, 1966).



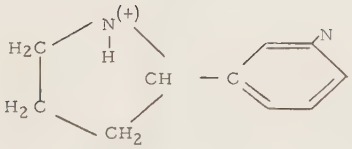
d-tubocurarine



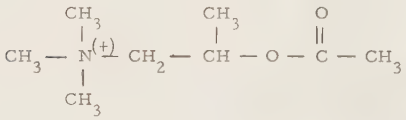
Atropine



Physostigmine = ésérine



Nicotine



Acétyl - β - méthylcholine

2 - Résultats.

a - Injection ionophorétique d'ACh (potentiel d'ACh = Pot. d'ACh).

Selon TREHERNE et SMITH (1965 a), la barrière limitant la pénétration de l'ACh serait due à l'intense activité cholinestérasique située au niveau de la couche gliale externe et des sites synaptiques neuropilaires. Afin d'éviter les effets de cette barrière, il paraissait intéressant d'injecter l'ACh par ionophorèse, à l'aide de microélectrodes introduites au voisinage présumé des sites synaptiques (voir technique p.116). Cette technique présente en outre l'avantage de limiter le champ d'action de l'ACh.

α - Action de l'ACh sur l'élément postsynaptique.

Sous l'action de l'ACh libérée par des chocs rectangulaires, la fibre géante répond par une dépolarisation transitoire dont un exemple typique est donné dans la fig. 79. L'amplitude de la dépolarisation est d'autant plus importante que la quantité d'électricité et donc la quantité d'ACh est plus élevée. La courbe qui traduit ces résultats (fig. 79) tend vers un niveau de saturation, pour lequel l'amplitude du potentiel d'ACh demeure alors sensiblement constante. Cela peut signifier que tous les récepteurs cholinergiques pouvant être atteints par l'ACh sont saturés. Dans la fig. 80, nous avons regroupé tous les sites ayant montré une dépolarisation de la fibre géante II sous injection d'ACh. En comparant avec l'étendue du champ dendritique, il apparaît que les récepteurs cholinergiques seraient répartis sur l'ensemble de ce champ. Il n'est pas exclu, *a priori*, qu'une part de la réponse observée soit liée au courant utilisé pour déplacer les ions ACh^+. En fait, si on inverse le sens du courant, l'effet produit n'est représenté que par un léger artéfact (fig. 81, photo n°4). L'ACh a, en conséquence, une action dépolarisatrice.

Mais cette dépolarisation est-elle accompagnée ou non d'une augmentation de la conductance membranaire ? Pour le savoir nous avons testé l'évolution de la résistance membranaire (Rm) postsynaptique selon la méthode représentée par la fig. 18, B. La fig. 81, tracé n°2, montre que pendant toute la dépolarisation qui se développe au cours de l'injection d'ACh, on observe un tel déséquilibre.

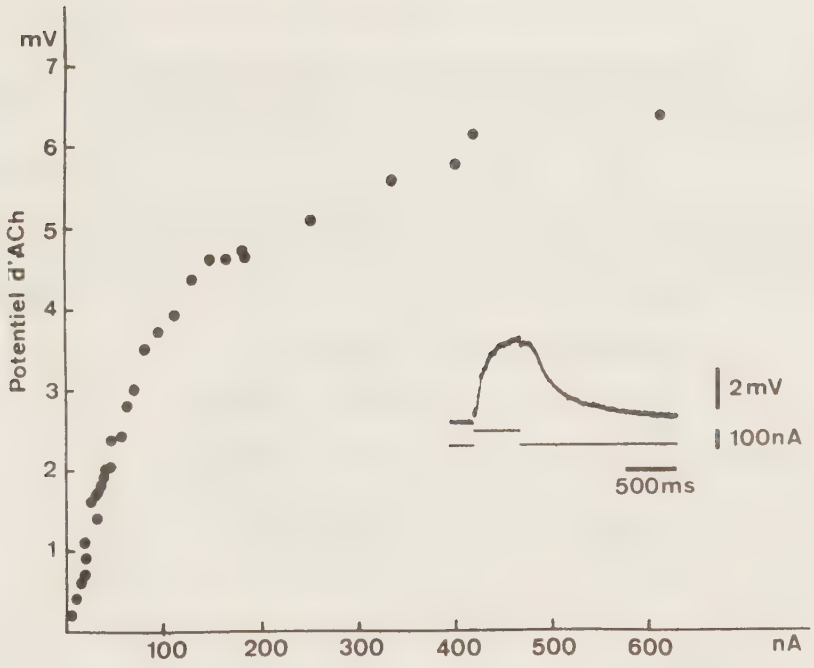


Fig. 79 - Relations entre l'amplitude du potentiel obtenu par l'injection ionophorétique d'ACh et l'intensité du courant passant par la microélectrode.

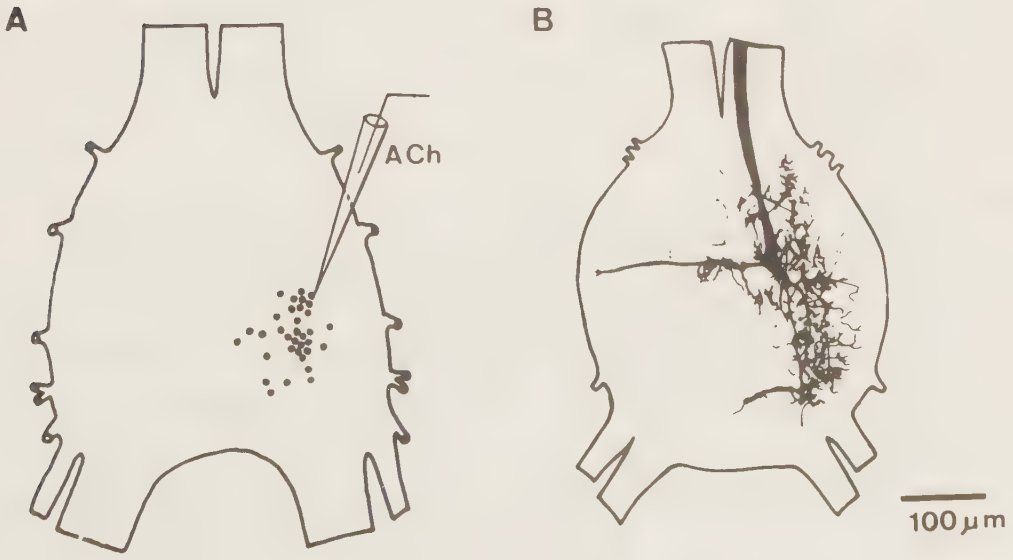


Fig. 80 - Comparaison entre les sites où l'injection d'ACh détermine une dépolarisation de la fibre géante II (A) et l'étendue du champ dendritique de la même fibre (B) ; d'après MILBURN et BENTLEY (1971). Ces points sont situés à différentes profondeurs et il est même fréquent que plusieurs réponses soient possibles au cours d'une même prospection Leur position est repérée par rapport à la bordure latérale d'une part et à la base du nerf cercal XI d'autre part.

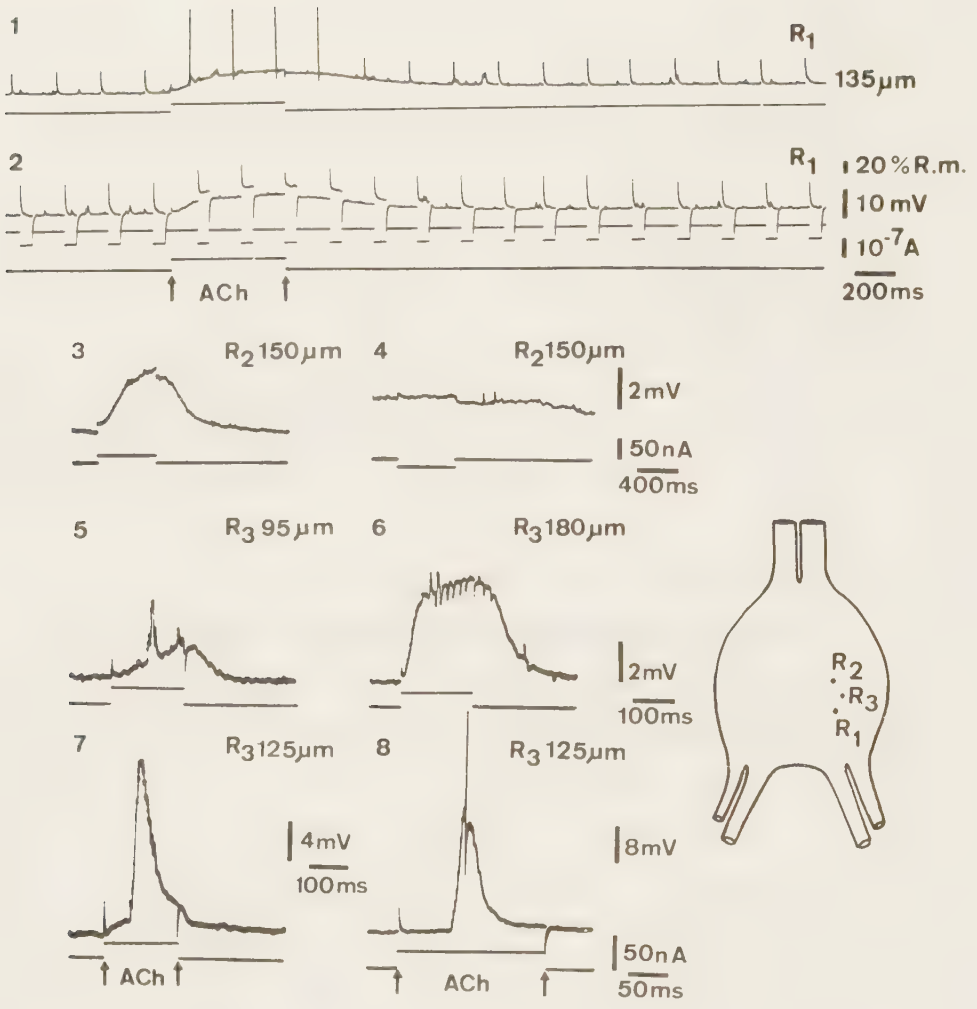


Fig. 81 - Effets de l'injection ionophorétique d'ACh sur la membrane de la fibre géante II et sur les terminaisons présynaptiques.

1 - Au cours du Pot. ACh (tracé du haut), le PPSE dû à la stimulation du nerf XI homolatéral, d'abord inefficace, devient capable d'engendrer un potentiel d'action propagé, bien que son amplitude diminue légèrement.

2 - Variation de la résistance membranaire (R.m.) au cours du Pot. ACh. Le pont de Wheatstone, équilibré selon l'exemple représenté dans la fig. 18 B, se déséquilibre pendant toute la durée de la dépolarisation (tracé du haut).

3 et 4 - Lorsque l'électrode est négative, aucun potentiel n'apparaît (photo n°4) alors qu'on obtient un Pot. ACh en inversant le sens du courant (électrode positive) (photo n°3).

5 et 6 - Des PPSEs et PPSIs unitaires se greffent parfois sur le Pot. ACh, traduisant indirectement la dépolarisation de fibres présynaptiques excitatrices et inhibitrices.

7 et 8 - L'action de l'ACh sur les terminaisons présynaptiques est suffisamment importante pour y déclencher une salve de potentiels d'action à haute fréquence. Elle engendre postsynaptiquement une dépolarisation se greffant sur le Pot. ACh, capable dans certains cas, de donner un potentiel d'action propagé. Noter sur la photo n° 8, au cours de la dépolarisation, la succession des épaulements marquant la sommation de PPSEs unitaires (voir texte).

R_1, R_2, R_3 : sites d'injection de l'ACh à différentes profondeurs notées en regard de chaque enregistrement. La microélectrode d'ACh est toujours introduite par la face dorsale du ganglion A_6.

En intercalant une résistance étalon que l'on peut soustraire ou au contraire ajouter au circuit, on peut parfaitement déterminer le sens de ce déséquilibre et évaluer la variation de la résistance. On démontre ainsi que l'ACh provoque toujours une diminution de la résistance de la branche du pont de Wheatstone où se situe la préparation (les trois autres résistances demeurant constantes). Cette variation se maintient souvent bien après la fin du courant injectant l'ACh et ne peut être confondue avec un artéfact électrique. Autrement dit, il s'agit bien d'une augmentation de la conductance membranaire (Gm). Au cours du potentiel développé par l'injection d'ACh, le PPSE obtenu simultanément par la stimulation du nerf XI diminue d'amplitude ce qui est conforme à une diminution concomitante de Rm. Cependant, au cours de ce potentiel, le seuil est abaissé et un PPSE préalablement inefficace peut devenir efficace et déclencher un potentiel d'action propagé (fig. 81, tracé n° 1). Ces expériences montrent que l'ACh déposée artificiellement au voisinage de la membrane postsynaptique est capable de dépolariser cette membrane et d'augmenter la conductance à des ions de nature inconnue.

Il est très important de chercher à savoir si un candidat médiateur est capable d'ouvrir les mêmes " pores ioniques " que ceux du médiateur naturel. Malheureusement, nous ne pouvons accéder directement à la mesure de ces courants ioniques. Cependant,il est possible d'opérer indirectement. Dans la fig. 82, nous avons regroupé les courbes traduisant les variations du PPSE " naturel " et du Pot. ACh en fonction d'un courant polarisant Sous l'action d'un courant hyperpolarisant, le Pot. ACh s'accroît en amplitude et diminue par contre pour des courants dépolarisants. Les variations qu'il subit sont approximativement superposables à celles du PPSE. Il est par conséquent logique de penser qu'ils ont des potentiels d'inversion voisins et ainsi qu'ils sont supportés par les mêmes courants ioniques. Afin de spécifier la nature des ions qui sont à l'origine de ces courants, il aurait été souhaitable de modifier artificiellement leur concentration extérieure, afin de provoquer d'éventuelles variations dans le potentiel d'inversion. De telles expériences n'ont pas été tentées à cause des difficultés rencontrées pour faire une mesure précise du potentiel d'inversion du PPSE (voir p.153).

Lorsque l'ACh est appliquée de façon répétitive par des chocs électriques égaux, l'amplitude de la réponse dépolarisante postsynaptique diminue

progressivement (fig.83). La quantité d'ACh libérée par chaque choc électrique étant supposée constante, nous pouvons admettre que la sensibilité de la membrane postsynaptique vis-à-vis de l'ACh décroît avec la répétition. Ce phénomène semble comparable à la " désensibilisation" observée à la synapse neuromusculaire (KATZ et THESLEFF, 1957) et au niveau de la membrane somatique de certains Invertébrés, notamment l'Aplysie (TAUC et BRUNER, 1963).

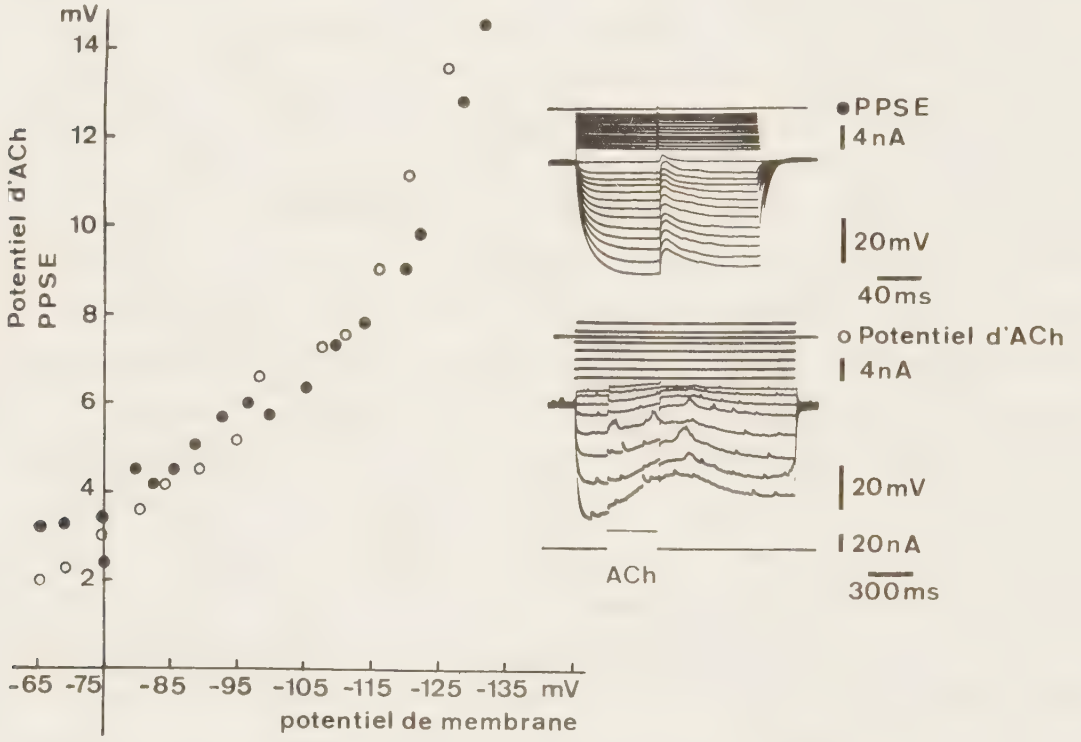


Fig. 82 - Relations entre l'amplitude du PPSE monosynaptique homolatéral d'une part, et celle du Pot. ACh d'autre part, en fonction du potentiel de membrane déplacé par des chocs électrotoniques rectangulaires. L'amplitude du Pot. ACh a été ajustée pour être, au potentiel de repos, égale à celle du PPSE. Noter que les deux courbes obtenues sont approximativement superposables.

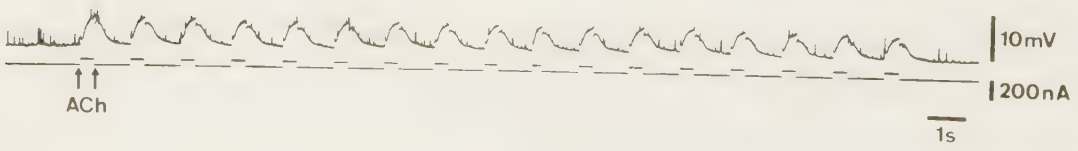


Fig. 83 - " Désensibilisation " des récepteurs cholinergiques postsynaptiques. L'application répétée de microdoses égales d'ACh est suivie par une légère diminution du Pot. ACh.

En résumé, ces diverses expériences nous ont permis de montrer que l'ACh a une action dépolarisatrice accompagnée d'une augmentation de la conductance de la membrane postsynaptique. De plus, il apparaît que vraisemblablement, le Pot. ACh et le PPSE sont supportés par les mêmes courants ioniques.

β - Action de l'ACh sur les terminaisons présynaptiques.

Les fibres cercales présynaptiques étant en relation étroite avec la fibre postsynaptique, on peut s'attendre à ce que l'ACh injectée puisse agir simultanément à ces deux niveaux.

Lorsque la microélectrode d'ACh est située dans le quart postérieur du ganglion, on observe parfois, greffés sur le Pot. ACh , des PPSEs ou des PPSIs unitaires (fig. 81, photos n° 5 et 6) ou même des dépolarisations plus importantes correspondant à la sommation de plusieurs PPSEs unitaires (fig. 81, photo n° 7). Il est vraisemblable que, dans ces exemples, certaines fibres cercales sont dépolarisées au point de donner naissance à des salves de potentiels d'action auxquels correspondent des PPSs dépolarisants ou hyperpolarisants. En particulier, dans l'exemple de la fig. 81, photo n°6, une volée de PPSIs unitaires accompagne deux PPSEs unitaires. Ces faits démontrent que deux fibres présynaptiques proches l'une de l'autre, l'une inhibitrice, l'autre excitatrice, ont été dépolarisées sous l'action de l'ACh et qu'elles sont en relation avec la fibre géante II.

Exceptionnellement, la sommation de tels PPSEs est suffisante pour déclencher un potentiel d'action propagé (fig. 81, photo n° 8). L'exemple cité présente ceci de remarquable: la dépolarisation, très ample (25 mV environ), s'accroît par paliers sensiblement réguliers, ce qui suggère l'intervention d'une seule fibre présynaptique. Chaque PPSE unitaire se greffe sur le sommet du PPSE précédent assurant ainsi une sommation maximum. Le temps de montée d'un PPSE étant de 2 ms (voir p.126), le seuil est atteint en une douzaine de paliers dont la durée totale est de 20 à 25 ms. La fréquence atteinte pendant cette salve est environ de 500 par seconde, fréquence nettement supérieure à la fréquence maximum d'un mécanorécepteur en relation avec la fibre géante (370 par seconde). Le seuil élevé peut s'expliquer par des propriétés accommodatrices de la fibre.

Tout ceci concourt à démontrer que, dans les conditions naturelles, un seul récepteur cercal,fonctionnant à la fréquence maximum, n'est pas capable de dépolariser suffisamment le site initial de la fibre géante et ainsi de déclencher un influx propagé. Ces observations suggèrent également que les fibres cercales peuvent être dépolarisées par l'ACh et qu'elles sont encore excitables au voisinage du champ dendritique de la fibre postsynaptique.

b - Action de l'ACh sur le ganglion A_6 entier dégainé.

Le milieu physiologique normal, additionné de chlorure d'acétylcholine, perfuse le ganglion entier. Lorsque la gaine ganglionnaire est intacte, l'ACh n'a pratiquement aucun effet sur l'activité ganglionnaire, ce qui confirme les résultats des anciens auteurs (voir p. 55). Il suffit d'inciser légèrement cette gaine pour favoriser l'action de l'ACh. A des concentrations relativement élevées (5.10^{-4} à 5.10^{-3} g/ml) et variant d'une expérience à l'autre, nous avons observé (fig. 84) une dépolarisation progressive de la fibre postsynaptique accompagnée d'une diminution de la résistance membranaire (Rm) et du PPSE. Cette dépolarisation est parfois suffisamment importante pour donner naissance à une salve de potentiels d'action propagés.

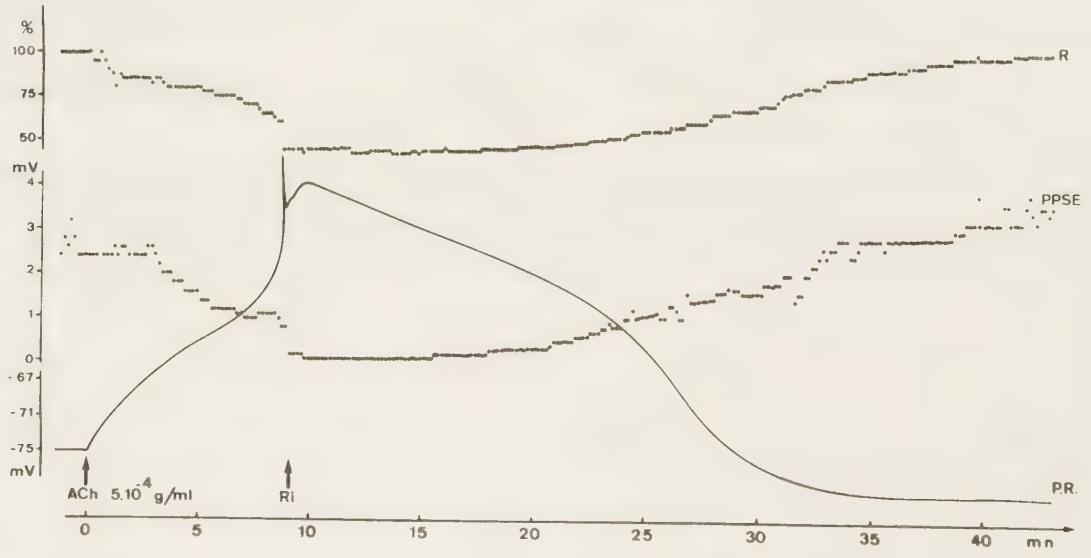


Fig. 84 - Application d'ACh au ganglion A_6 entier dégainé.
De haut en bas, diminution concomitante de la résistance membranaire (R.m.), de l'amplitude du PPSE monosynaptique homolatéral et du potentiel de membrane (P.R.). La fibre se dépolarise très rapidement et engendre une salve de potentiels d'action. La récupération se fait plus lentement après remise en perfusion (Ri.). L'échelle du bas à gauche est tronquée; elle s'adresse au potentiel de membrane.

Il n'est pas rare, auparavant, d'observer des potentiels d'action de fibres voisines (petits potentiels diphasiques inférieurs à 1 mV; voir fig. 22). apparaissant également en salves plus ou moins prolongées. Cela indique que ces fibres ont atteint un niveau de dépolarisation plus important avant la fibre géante interrogée. Dans ces expériences, il est possible d'interpréter la diminution de Rm comme une augmentation, sous l'action de l'ACh, de la conductance membranaire à certains ions. La diminution du PPSE peut s'expliquer tout simplement par la chute de Rm. Ces résultats sont par conséquent en accord avec ceux obtenus par l'injection ionophorétique d'ACh.

c - Action de substances agonistes de l'ACh.

α - Action de la nicotine.

Cette substance est un des représentants les plus typiques de la série nicotinique. Appliquée au ganglion A_6 dégainé, elle a une action importante et rapide tout à fait comparable à celle de l'ACh. Elle se traduit par une dépolarisation qui peut aller jusqu'à la salve de potentiels d'action pour des concentrations bien plus faibles que pour l'ACh (5.10^{-7} à 10^{-6} g/ml).

β - Action de l'acétyl-β - méthylcholine (= Mécholyl, = Métacholine).

Selon BARLOW (1964) et plus récemment CHOTHIA (1970), BAKER, CHOTHIA, PAULING et PETCHER (1971), l'acétyl-β - méthylcholine est un représentant type de la série muscarinique. Lorsque nous perfusons le ganglion A_6 par cette substance, à des concentrations élevées (10^{-3} à 5.10^{-3} g/ml), la fibre se dépolarise et peut induire également une salve de potentiels d'action. Cette action est par conséquent tout à fait comparable à celle de l'ACh.

Cette relative insensibilité du ganglion à l'acétyl-β - méthylcholine peut s'expliquer si l'on sait qu'elle peut être hydrolysée par l'AChE (AUGUSTINSSON et ISACHSEN, 1957), à peu près dans les mêmes proportions que l'ACh. Ce fait peut constituer un argument supplémentaire en faveur de l'existence d'une barrière cholinestérasique (voir p. 238).

d - Action de substances antagonistes de l'ACh.

α - d-tubocurarine (d.TC = Curare).

- Action du curare sur les PPSEs et PPSIs évoqués

Le PPSE monosynaptique déclenché par la stimulation électrique des nerfs cercaux est profondément affecté par le curare (fig. 85).

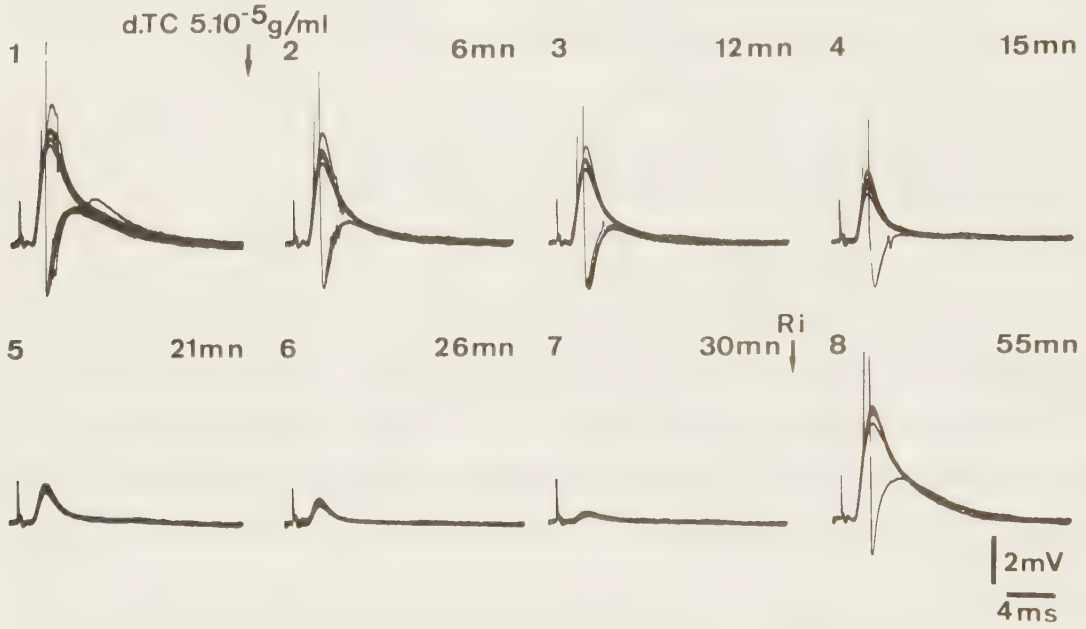


Fig. 85 - Effets du curare (d.TC) sur le PPSE monosynaptique homolatéral. Le nerf cercal est stimulé à la fréquence de 5/s au cours de chaque enregistrement. Certains d'entre eux présentent des potentiels d'action au début de chaque série de stimulations. Après retour au liquide physiologique normal (Ri), la récupération s'accomplit en 25 minutes.

Il diminue progressivement, plus ou moins rapidement selon la préparation expérimentée et la concentration (10^{-5} à 5.10^{-4} g/ml), et l'effet est la plupart du temps entièrement réversible. Ce PPSE évoqué correspond à la sommation synchrone de nombreux PPSEs unitaires, ce qui permet de supposer que toutes les réponses postsynaptiques dues aux afférences excitatrices subissent l'action du curare. Il en est de même pour le premier PPSE retardé qui subit également une diminution progressive de son amplitude (fig. 86).

Les PPSIs déclenchés par la stimulation des nerfs X sont aussi rapidement supprimés par le curare.

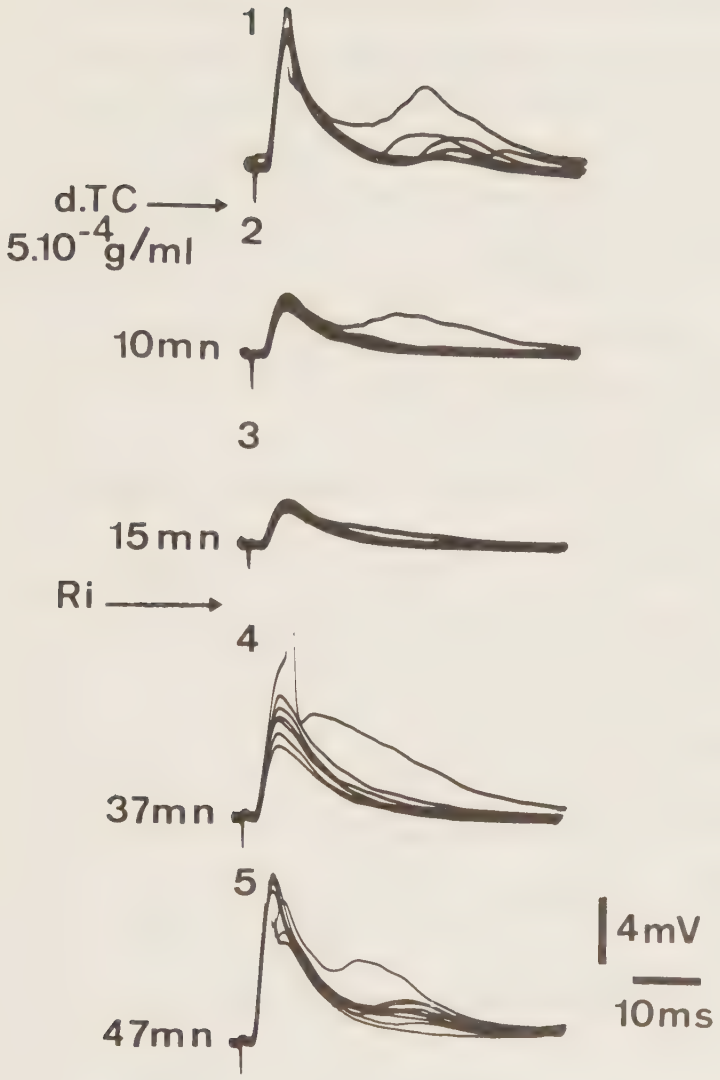


Fig. 86 - Effets du curare (d.TC) sur les PPSEs monosynaptique et retardé. Les deux potentiels s'amenuisent simultanément et réapparaissent après retour au liquide physiologique normal (Ri).

- Action du curare sur les PPSEs et PPSIs unitaires

. Action sur les PPSEs unitaires

Sous l'action du curare, tous les PPSEs unitaires diminuent d'amplitude, plus ou moins rapidement, selon la préparation et la concentration utilisée. Afin de s'assurer que chaque PPSE n'est pas bloqué en " tout ou rien ", nous avons étudié l'action du curare sur un PPSE unitaire lié à l'activité d'un seul récepteur (fig. 87). Dans cette figure, le potentiel d'action présynaptique est dérivé sur le nerf cercal et est utilisé pour déclencher le balayage de l'oscilloscope. Tous les autres récepteurs sont réduits au silence par un assèchement complet des cerques. Le PPSE unitaire, sous l'action du curare, diminue

régulièrement d'amplitude, ce qui est compatible avec une action progressive, soit sur des récepteurs cholinergiques, soit sur la libération du médiateur. L'action du curare est totalement réversible et n'affecte pas de façon sensible le potentiel de membrane et la résistance de la fibre postsynaptique. Chaque PPSE de la fig. 87 est précédé d'un potentiel cercal électrotonique de très faible amplitude. Ce potentiel est encore visible même lorsque le PPSE a pratiquement été éliminé par le curare (photo n° 7). Ces faits laissent suggérer que le curare a sans doute peu d'action sur la conduction du potentiel d'action jusqu'aux terminaisons présynaptiques.

. Action sur les PPSIs unitaires " spontanés".

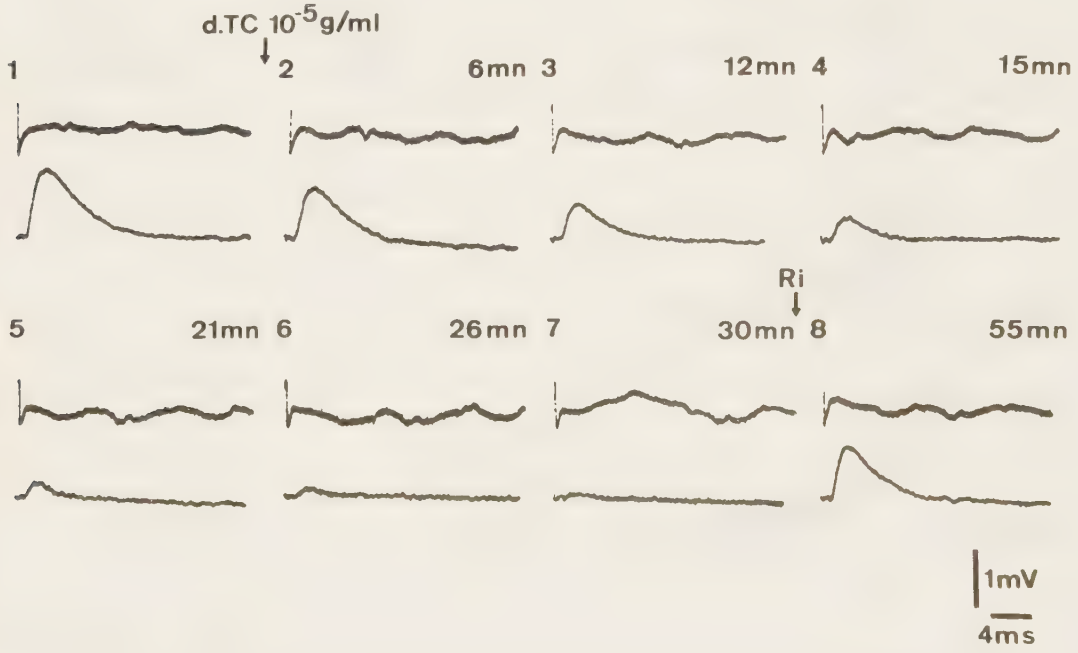


Fig. 87 - Effets du curare (d.TC) sur le PPSE unitaire lié à l'activité d'un seul mécano-récepteur cercal. Ce dernier est stimulé mécaniquement et le potentiel d'action dérivé par électrodes externes sur le nerf XI est utilisé pour déclencher le balayage de l'oscilloscope. Ri.= retour au liquide physiologique normal.

. Action sur les PPSIs unitaires "spontanés".

Chez la Blatte, d'une manière générale, l'action des drogues sur les PPSIs unitaires est difficile à mener à bien, du fait que peu de préparations présentent cette catégorie de potentiels pendant une durée suffisamment longue. Nous avons vu qu'il est cependant possible de provoquer des PPSIs unitaires par stimulation indirecte de récepteurs cercaux non identifiés. Ces récepteurs seraient reliés à la fibre géante par un circuit disynaptique, aussi est-il possible

que la drogue agisse au niveau du premier relais. Il est préférable de trouver une expérience particulièrement favorable où un interneurone est activé " spontanément " pendant environ une heure.

La fig. 88 a été obtenue dans de telles conditions. Elle permet en outre l'analyse simultanée de l'action du curare sur les PPSIs unitaires dépendant d'un seul et même interneurone, et des PPSEs unitaires liés à l'activité d'un seul récepteur.

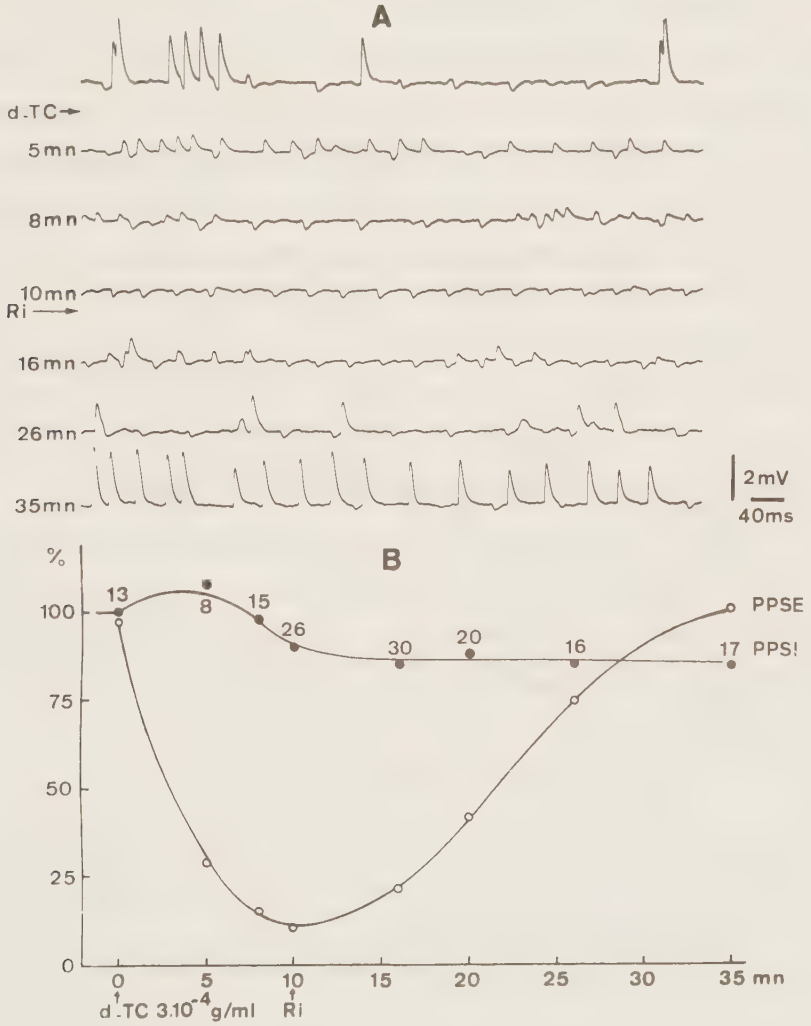


Fig. 88 - Effets simultanés du curare (d.TC) sur les PPSIs unitaires " spontanés " liés à l'activité d'un seul neurone présynaptique et les PPSEs unitaires correspondant à un seul mécanorécepteur cercal.
Chaque point des deux courbes correspond à la moyenne des amplitudes d'une quinzaine de potentiels. Les nombres accompagnant les points de la courbe-PPSI expriment la fréquence moyenne des PPSIs au cours de chaque séquence étudiée.
Ri = retour au liquide physiologique normal.

Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des amplitudes d'une quinzaine de potentiels, pris au cours d'une même séquence. Il est associé aux PPSIs un nombre qui exprime leur fréquence au cours de chaque séquence. Les faibles modifications de leur amplitude peuvent être en partie expliquées par la variation de fréquence d'une séquence à l'autre.

Il ressort de cette expérience que seuls les PPSEs unitaires sont profondément affectés par le curare qui n'a apparemment qu'une très faible, sinon aucune action sur les PPSIs unitaires, ce qui est confirmé par de nombreux autres essais malheureusement fragmentaires pour les raisons données plus haut (1). Ce fait paraît surprenant si on se rapporte à l'expérience précédente où les PPSIs évoqués sont au contraire très affectés par la drogue. Cependant, il s'explique aisément si l'on admet l'hypothèse d'un circuit disynaptique dans lequel le premier relais serait de nature cholinergique. Il n'est pas exclu que les interneurones qui sont à l'origine de l'activité inhibitrice " spontanée " soient de nature différente de ceux mis en activité par les afférences cercales inhibitrices empruntant les nerfs X. Cela paraît peu vraisemblable, et sera confirmé plus loin par l'action de la picrotoxine (p. 270) qui affecte les deux types de PPSIs sans modifier les PPSEs.

Par conséquent,à l'issue de ces expériences, il est possible de penser que les PPSIs sont dus, soit à l'action d'un deuxième médiateur, différent de l'ACh, soit à la mise en jeu, sous l'action de l'ACh, de récepteurs ou de " pores ioniques " différents.

- Action du curare sur le Pot. ACh.

Si l'ACh est bien le médiateur libéré par les terminaisons cercales excitatrices, il est *a priori* logique de penser que la drogue antagoniste doit avoir les mêmes effets sur les potentiels dus, d'une part au médiateur naturel, et d'autre part à l'ACh injectée artificiellement.

Dans l'expérience illustrant la fig. 89, nous enregistrons simultanément le PPSE monosynaptique sub-maximal (nerf XI homolatéral) et le Pot. ACh obtenu par injection d'ACh à 210 µm de profondeur, par conséquent au

(1) L'action particulière de la choline sur les interneurones inhibiteurs (voir p. 136) devrait autoriser une étude plus systématique, d'ailleurs généralisable à l'étude d'autres drogues sur les PPSIs unitaires.

centre du ganglion. Sous l'action du curare, les deux types de potentiels subissent une réduction progressive de leur amplitude qui peut aller jusqu'à l'annulation complète si le curare agit suffisamment longtemps. Nous observons que la durée d'action est,dans cet exemple, relativement longue et que les deux potentiels n'évoluent pas de façon rigoureusement parallèle. Le PPSE évoqué commence à diminuer en amplitude quelque temps avant le Pot. ACh, ce qui paraît normal compte-tenu de l'extension du champ dendritique et du nombre de fibres cercales sollicitées par la stimulation submaximale. On suppose évidemment que la répartition des sites synaptiques se fait sur l'ensemble de ce champ et que le curare , en pénétrant progressivement dans le ganglion, affecte en premier les sites externes. L'interaction du curare avec les récepteurs profonds impliqués lors de l'injection artificielle d'ACh,se manifeste un peu plus tardivement, mais peut être également complète.

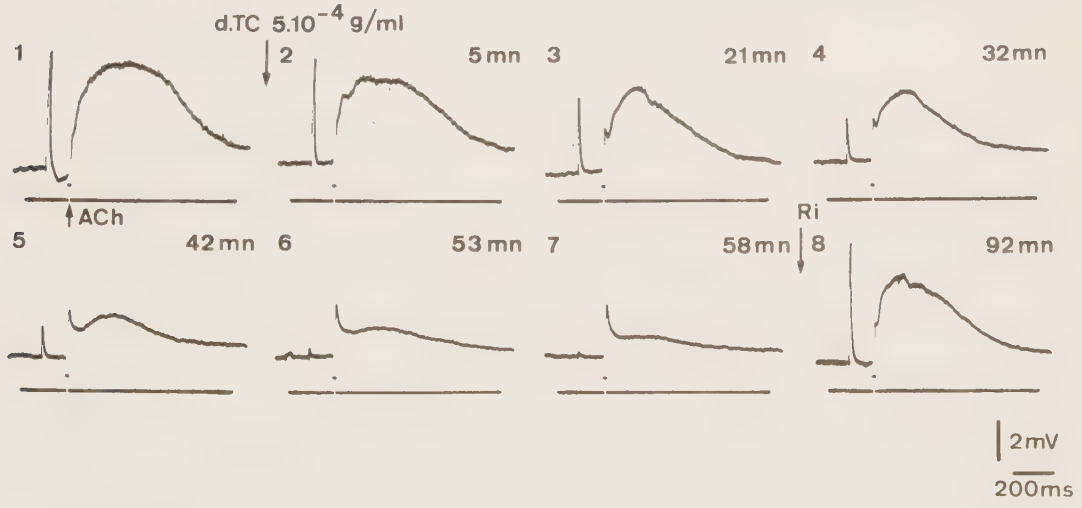


Fig. 89 - Effets comparatifs du curare (d.TC) sur le PPSE monosynaptique homolatéral et le Pot. ACh. Ri = retour au liquide physiologique normal .

La durée d'action du curare (et ceci est valable également pour les autres substances appliquées sur le ganglion entier) varie considérablement d'une expérience à l'autre (elle est en moyenne de 25 à 40 minutes, mais peut s'étendre de 10 minutes à une heure environ). Nous avons pu observer qu'elle semble étroitement liée à la façon dont est incisée la gaine

ganglionnaire. Il est en effet souvent difficile d'éviter, au cours de cette manipulation, des tiraillements du ganglion dans son entier. Il se crée sans doute une sorte de brèche plus ou moins importante au niveau des corps cellulaires et des cellules gliales externes qui, selon son importance, facilite plus ou moins la pénétration des drogues et du curare en particulier.

Malgré ces quelques difficultés et restrictions, ces diverses expériences suggèrent qu'il y a identité d'action du curare sur tous les PPSEs et sur le Pot. ACh et que les sites récepteurs postsynaptiques seraient les mêmes dans les deux cas.

β - Atropine (sulfate d'atropine)

- Action de l'atropine sur les PPSEs unitaires et évoqués.

Les effets de cet alcaloïde sont sensiblement voisins de ceux du curare. Les PPSEs unitaires déclenchés par la stimulation mécanique d'un seul récepteur (fig. 90) subissent une diminution progressive de leur amplitude. Toutes les afférences excitatrices sollicitées par la stimulation électrique supraliminaire des nerfs cercaux montrent les mêmes effets (fig. 91). Cette figure montre également que le premier PPSE retardé est totalement annulé. Dans la plupart des cas, la réversibilité est pratiquement complète et, ainsi que le curare, l'atropine n'a aucune action sensible sur le potentiel et la résistance membranaires. Les concentrations efficaces sont légèrement plus élevées que celles du curare et s'étalent entre 10^{-4} et 7.10^{-4} g /ml pour obtenir un blocage complet de la transmission en 30 mn environ.

Lors des premières expériences de cette série, nous avons utilisé de l'atropine pure. Sous cette forme, elle est beaucoup plus difficile à diluer, ce qui la rend , de ce fait, beaucoup moins efficace. Sous forme de sulfate d'atropine, telle que nous l'avons utilisée par la suite, la dissolution est aisée et les effets obtenus plus nets et plus constants. Nous n'avons pas étudié les effets éventuels de l'atropine sur les PPSIs unitaires.

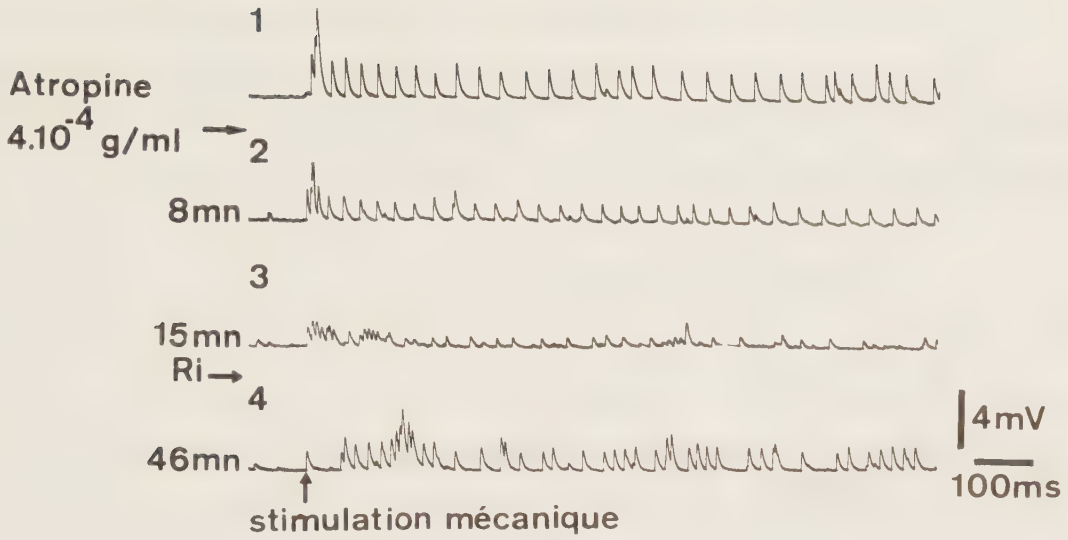


Fig. 90 - Effets de l'atropine sur les PPSEs unitaires liés à l'activation mécanique d'un seul mécanorécepteur cercal. Il s'agit ici d'un mécanorécepteur de type " tonique " qui présente une brève composante phasique initiale (sommation temporelle). Après retour au liquide physiologique normal (Ri), la récupération n'est pas, dans cet exemple, tout à fait complète, même au bout de 31 minutes.

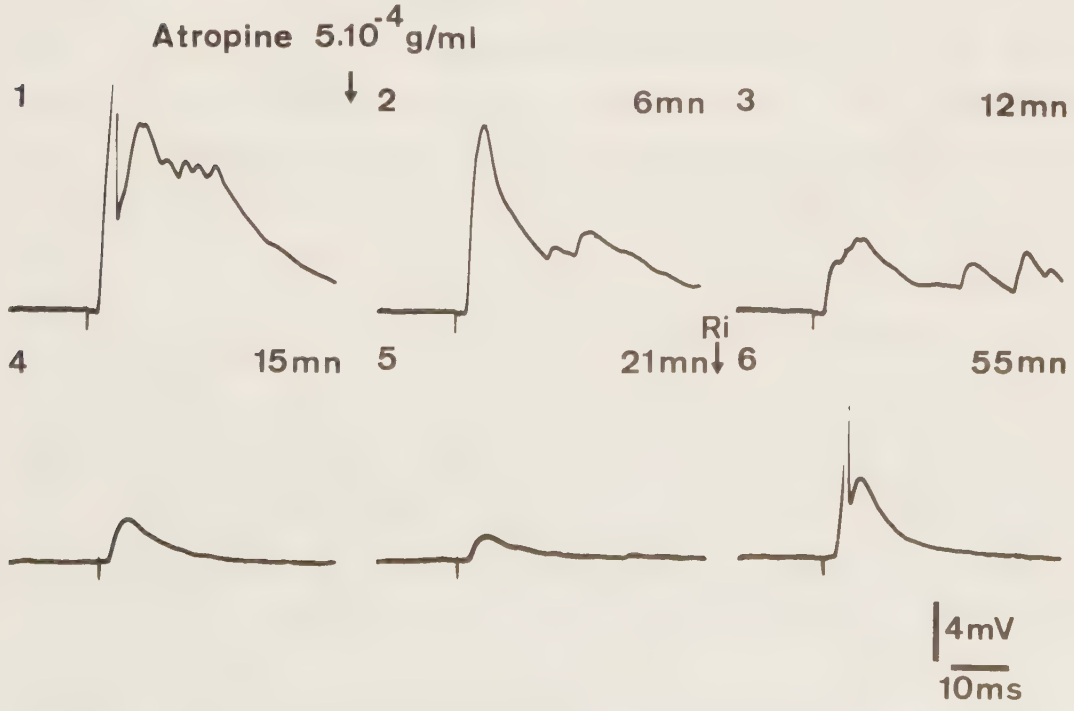


Fig. 91 - Effets de l'atropine sur les PPSEs monosynaptique et retardé. Après retour au liquide physiologique normal (Ri), le PPSE retardé n'a pas retrouvé son amplitude initiale.

- Action de l'atropine sur le Pot. ACh.

Le Pot. ACh subit un effet dépresseur (fig.92) tout à fait comparable à celui observé par l'action du curare. Les remarques que nous avons formulées alors sont également applicables ici, dans les mêmes conditions.

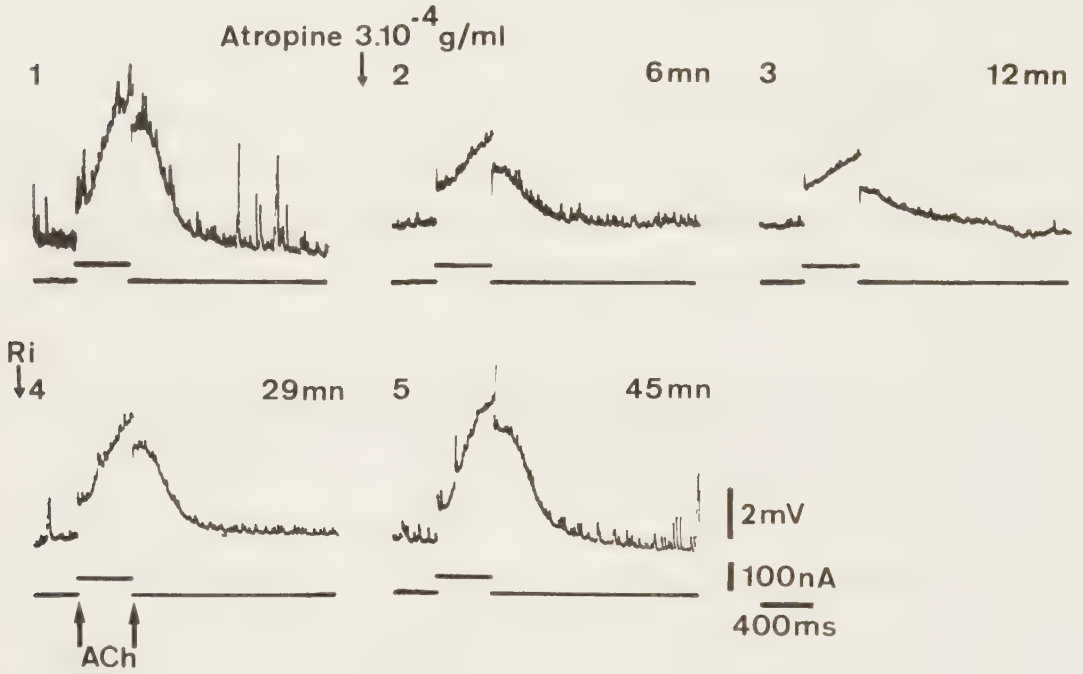


Fig. 92 - Effets de l'atropine sur le Pot. ACh. Noter la présence d'une activité de base " spontanée " composée de nombreux PPSEs unitaires. Ils subissent parallèlement au Pot. ACh les effets dépresseurs de l'atropine. Après retour au liquide physiologique normal (Ri), la récupération est complète.

e - Action d'une anticholinestérase : l'ésérine (= physostigmine).

Les cholinestérases étant des enzymes qui hydrolysent l'ACh, leur blocage par les anticholinestérases doit théoriquement prolonger et renforcer l'action de l'ACh, autrement dit prolonger les potentiels postsynaptiques et accroître leur amplitude. Si tel est le cas, le même effet doit pouvoir être obtenu avec le transmetteur naturel et le candidat médiateur.

α- Action de l'ésérine sur les PPSEs unitaires et évoqués

Cette étude est facilitée lorsque la préparation est totalement silencieuse. Pour des concentrations n'excédant pas 2.10^{-7} g/ml, les effets de l'ésérine ne sont pas spectaculaires. Ils se traduisent (fig. 93) par une

légère augmentation de l'amplitude et un prolongement significatif des PPSEs (mesures basées sur la valeur du demi-temps de descente). Les points représentés sur la courbe de la fig. 93 , B ne correspondent qu'à des PPSEs totalement isolés afin d'éviter, autant que possible, une interférence avec des PPSEs voisins. Si on augmente la concentration de l'ésérine (5.10^{-7} g/ml), les PPSEs unitaires deviennent de plus en plus nombreux (fig. 94, photos n°1 à 4) ce qui rend difficile l'étude sur des échantillons isolés. Cependant, nous avons pu observer qu'en début d'action, les PPSEs unitaires liés à un seul récepteur cercal augmentent rapidement d'amplitude. Parallèlement, les effets sur le PPSE évoqué sont extrêmement importants (fig. 94). Ils dénotent une très nette augmentation de l'amplitude et de la durée. Le PPSE dont la durée est voisine de 20 ms au départ peut atteindre plus d'une seconde dans la photo n° 6. Il est parfois suivi par une très forte et très longue dépolarisation (allant jusqu'à une dizaine de secondes dans la photo n° 7) sur laquelle se greffe une volée de potentiels d'action. Après une telle réponse (assimilable à un état de crise), une nouvelle stimulation survenant peu de temps après,ne peut déclencher qu'un PPSE plus petit et relativement bref, tandis que les PPSEs unitaires sont tous profondément déprimés (photo n° 8). Cette dépolarisation est accompagnée,sur les nerfs cercaux XI,d'une intense activité antidromique. L'ésérine agit donc, soit directement , soit indirectement, sur les fibres afférentes cercales (vraisemblablement sur les terminaisons présynaptiques). Une seule stimulation est alors suivie par une volée post-stimulative extrêmement longue. Après 5 à 7 minutes de repos ,une nouvelle stimulation est capable d'engendrer une réponse postsynaptique sensiblement identique. Pendant ce temps, la fibre postsynaptique commence très progressivement à se dépolariser; elle engendre bientôt une volée de potentiels d'action. La fibre se comporte alors exactement comme pendant l'action de l'ACh sur le ganglion non ésériné (fig. 84). A la concentration de 5.10^{-7} g/ml ces divers effets sont obtenus en 45 minutes. La réversibilité n'est jamais complète si la fibre a donné une salve de potentiels d'action. Pour des concentrations supérieures à 10^{-6} g/ml,la fibre postsynaptique commence à se dépolariser presqu' aussitôt. Elle est accompagnée d'une intense activité transitoire sur les nerfs afférents, indice d'une dépolarisation des fibres afférentes.

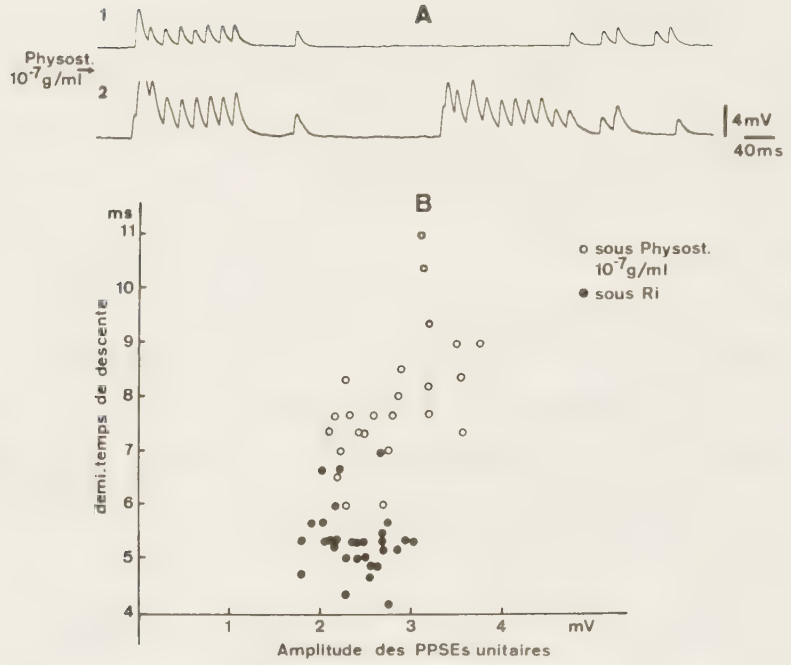


Fig. 93 - Effets de la physostigmine (ésérine) sur des PPSEs unitaires liés à l'activation mécanique d'un mécanorécepteur cercal de type phasique.

A - Quelques séquences phasiques et PPSEs isolés, avant et pendant l'action de l'ésérine.

B - Chaque point correspond à un PPSE unitaire isolé et exprime les effets de l'ésérine sur l'amplitude et l'allongement de chacun d'eux.

Fig. 94 - Effets de la physostigmine sur le PPSE monosynaptique homolatéral. Noter que parallèlement à l'accroissement en amplitude et à l'allongement du PPSE, apparaissent des PPSEs unitaires " spontanés " de plus en plus nombreux et apparemment plus amples. Sur la photo n°7, une seule stimulation brève induit un PPSE suivi par une très longue dépolarisation sur laquelle se greffe une volée de potentiels d'action. La même stimulation appliquée une minute plus tard (photo n°8) ne donne plus qu'un PPSE moins ample.

L'importance de la durée observée dans le cas d'un PPSE évoqué ne semble pas compatible avec la seule action de l'ésérine sur la ChE. Si on augmente progressivement l'intensité de la stimulation présynaptique d'une préparation ésérinée (5.10^{-7} g/ml), le PPSE augmente d'abord en amplitude sans variation importante de sa durée. Lorsque le PPSE atteint quelques mV, la durée s'accroît de plus en plus vite (fig.95) et prend rapidement des proportions énormes. La forme de la courbe obtenue suggère que tout se passe comme si le phénomène amorçait au départ un système fonctionnant en feed-back positif, à effets cumulatifs. Il est possible que l'ACh libérée non détruite réagisse en retour sur les terminaisons présynaptiques ce qui aurait pour effet d'accroître la quantité de médiateur libéré.

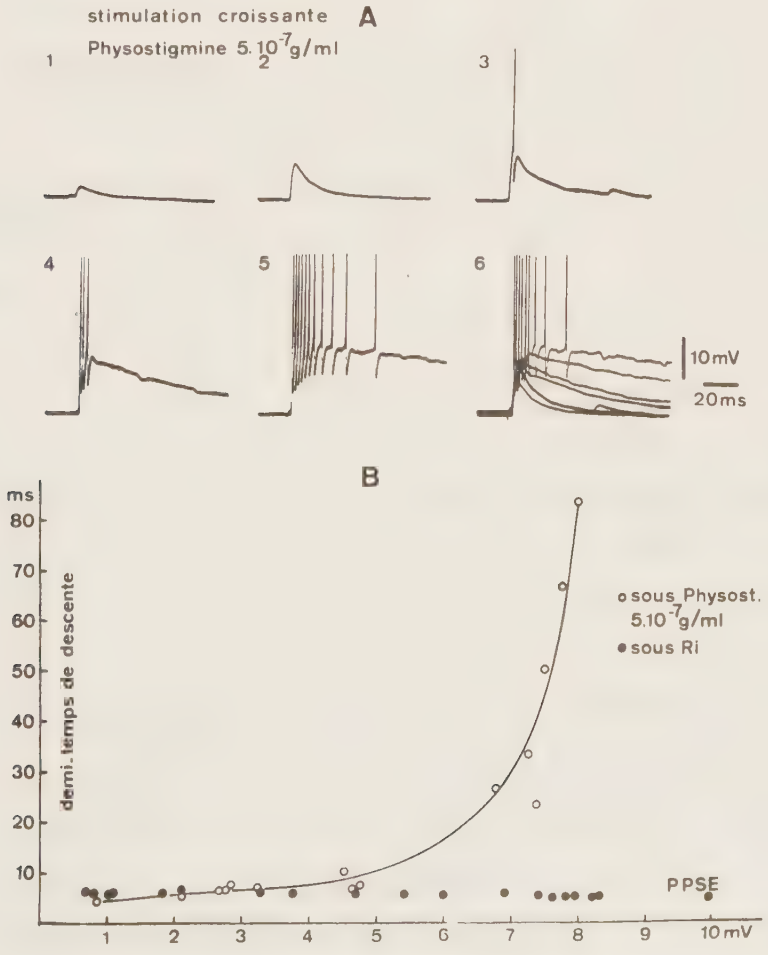


Fig. 95 - Relations entre l'amplitude et le demi-temps de descente du PPSE monosynaptique homolatéral, en présence de physostigmine et au cours de stimulations croissantes. Noter également le nombre de plus en plus grand de potentiels d'action propagés. Sur la photo n°6 sont représentés six enregistrements superposés obtenus au cours de stimulations d'intensité croissante. Ri = Ringer normal.

Au fur et à mesure que le recrutement des fibres présynaptiques stimulées augmente, la quantité d'ACh libérée s'accroît d'autant plus et peut au maximum vider l'ensemble des terminaisons de leur contenu immédiatement disponible (fig. 94, photo n° 7); cela expliquerait qu'une deuxième stimulation rapprochée reste presque inefficace (fig. 94, photo n° 8).

β - Action de l'ésérine sur le Pot. ACh

Aux concentrations utilisées précédemment (5.10^{-8} à 5.10^{-7} g/ml), l'ésérine a une action très nette sur le Pot. ACh fig. 96). Ce dernier, s'il n'augmente pas de façon sensible en amplitude, s'accroît par contre considérablement en durée.

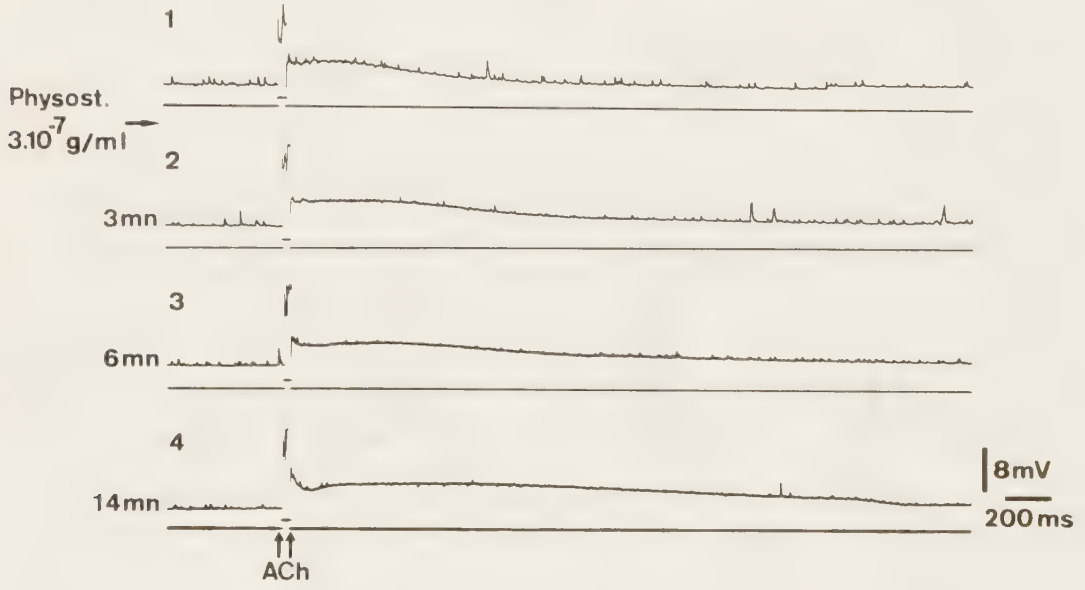


Fig. 96 - Effets de la physostigmine sur le Pot. ACh

γ - Discussion : effets pré- et postsynaptiques de l'ésérine.

De nos expériences il ressort que l'ésérine a un effet très marqué aussi bien sur les PPSEs que sur le Pot. ACh, ce qui suggère, indirectement, la présence d'une cholinestérase dans le ganglion A_6. Ces résultats confirment par conséquent les données histochimiques de SMITH et TREHERNE (1965). Ils laissent à penser, d'autre part, que la même substance est à l'origine des deux types de potentiels et appuient par conséquent le fait que l'ACh serait le médiateur des PPSEs. Cependant, la présence d'un système hydrolyseur n'est

pas indispensable dans le cycle d'un transmetteur, aussi ce critère n'est-il pas reconnu comme fondamental pour son identification.

Comment expliquer l'augmentation importante de la durée du PPSE au cours de stimulations croissantes, en présence d'ésérine (fig.95), alors que cette durée ne change absolument pas sous liquide physiologique normal ?

Plusieurs explications peuvent être avancées:

- une certaine quantité de cholinestérase reste peut-être encore active dans le ganglion ésériné. A faible intensité de stimulation, la quantité d'ACh libérée est faible, aussi l'enzyme hydrolysante a-t-elle une action relativement plus importante que lors d'une stimulation forte;
- lors d'une stimulation forte, la grande quantité d'ACh libérée ne serait pas éliminée rapidement par le seul processus de diffusion et agirait plus longtemps au niveau des récepteurs postsynaptiques, entraînant une prolongation de la variation de perméabilité membranaire. Ce facteur est considéré comme prédominant à la synapse neuromusculaire du diaphragme de Rat (KUBA et TOMITA, 1971);
- on peut également invoquer un facteur présynaptique. L'ACh agirait en retour en dépolarisant la membrane des terminaisons présynaptiques et en augmentant ainsi la quantité d'ACh libérée.

Cette dernière explication est tout à fait concevable chez la Blatte car l'action sur les terminaisons présynaptiques est vraisemblable (enregistrements de potentiels antidromiques sur les nerfs cercaux). Cet effet présynaptique a été décelé dans bien des cas et a fait l'objet d'études intensives avant tout dans le cadre de la pharmacologie des terminaisons motrices (voir la revue de RIKER et OKAMOTO, 1969). L'observation de décharges répétitives présynaptiques après action de l'ésérine n'est pas récente. Elle a été faite notamment à la synapse neuromusculaire, où MASLAND et WIGTON (1940) ont montré qu'après injection d'une anti-ChE (prostigmine), les fibres motrices sont l'objet de décharges ayant apparemment pour origine les terminaisons. Cette action est abolie par des doses de curare inférieures à celles nécessaires pour bloquer la transmission. Comme l'injection massive d'ACh déclenche également des réponses répétitives sur les mêmes terminaisons, on a pensé qu'elle peut les exciter directement et que les anti-ChE agiraient indirectement en facilitant l'accumulation d'ACh après inactivation de l'AChE. Selon KOELLE (1963) et ECCLES (1964), la

meilleure explication tiendrait compte de la présence de sites cholinocepteurs sur les terminaisons présynaptiques assurant l'action dépolarisatrice de l'ACh. Cette opinion est contestée par RIKER (RIKER et OKAMOTO, 1969) qui accorde davantage d'importance à des variations d'excitabilité non spécifique des terminaisons motrices dues à une action directe de l'anti-ChE.

Dans le ganglion A_6 de la Blatte, SMITH et TREHERNE (1965) ont montré qu'une cholinestérase est décelable à la surface externe des membranes d'éléments ayant les caractéristiques classiques d'éléments présynaptiques aussi bien qu'à la surface des membranes postsynaptiques. Ces faits ne sont pas en contradiction avec la présence possible de sites cholinergiques dans les membranes présynaptiques, sites qui pourraient expliquer l'action en retour de l'ACh à ce niveau, action qui serait à l'origine du mécanisme amplificateur bien visible sur la fig. 94, photo n° 8.

La fibre postsynaptique soumise pendant un temps assez long à un milieu ésériné se dépolarise. Cette action peut être due en partie à l'ACh accumulée après destruction de la ChE. Pour des concentrations d'ésérine supérieures à 10^{-6} g/ml, la dépolarisation est presque immédiate. Elle est accompagnée par une diminution de Rm, qui peut s'expliquer par une action importante et prolongée de l'ACh, et peut-être également par une action directe non spécifique de l'ésérine, sur les caractéristiques membranaires.

En résumé, il paraît fortement probable que l'action de l'ésérine ait des répercussions importantes au niveau des membranes pré-et postsynaptiques. Nous penchons pour une action indirecte, par l'intermédiaire de l'ACh, mais il n'est pas exclu que l'ésérine agisse dans une certaine mesure directement, de manière non spécifique.

3 - Conclusion partielle.

Compte-tenu des éléments que nous avons apportés par nos expériences, nous allons rassembler les critères qui nous semblent devoir être retenus en vue d'appuyer une transmission de nature cholinergique (1).

- Critères de reconnaissance d'une synapse chimique.

n° 1 Physiologiques:

a) On peut enregistrer un potentiel électrotonique (fig. 35 et 60). Il précède même parfois les PPSEs unitaires (fig. 41 et 87). Son amplitude est trop faible pour assurer une transmission électrique. Sa présence est cependant intéressante. Elle permet en particulier une mesure plus précise du délai synaptique.

c) Les PPSEs n'ont jamais pu être inversés par des chocs dépolarisants. Le potentiel d'inversion a été évalué par extrapolation (fig. 42). Ceci ne peut donc constituer un critère suffisant.

- Critères d'identification d'une substance comme médiateur chimique.

n° 5 Existence de récepteurs cholinergiques dans la fibre postsynaptique:

b) La transmission synaptique ainsi que le Pot. ACh sont bloqués par la d-tubocurarine et l'atropine (fig. 85, 87, 89, 90, 91 et 92). On peut en déduire que la membrane postsynaptique présenterait des récepteurs cholinergiques à sites nicotiniques et muscariniques. Cette idée est également renforcée par l'efficacité de deux substances agonistes appartenant respectivement à ces deux séries : la nicotine et l'acétyl-β-méthylcholine.

c) La micro-injection d'ACh entraîne une dépolarisation et une diminution de la résistance membranaire de la fibre géante postsynaptique (fig. 79 et 81).

(1) Remarquons que le problème du médiateur qui est à l'origine des PPSIs reste posé, notamment parce que l'ACh n'a jamais montré d'effets hyperpolarisants et que le curare est inefficace vis-à-vis des PPSIs unitaires.

n° 6 Identité d'actions physiologiques de la substance et du médiateur naturel:

b) Nous avons admis, par extrapolation, que la superposition des courbes courant-voltage du PPSE et du Pot. ACh permet de conclure à des potentiels d'inversion similaires. Ils pourraient correspondre, dans les deux cas, à des changements de perméabilité ionique similaires dans la membrane postsynaptique (6a) (fig. 82).

c) L'ACh injectée produit une diminution de la résistance membranaire Rm (fig. 81).

c') Une anticholinestérase (l'ésérine) prolonge le PPSE et le Pot. ACh ce qui permet de conclure à l'existence d'un système inactivateur commun (fig. 93, 94 et 96). Nous avons aussi montré que l'ésérine a des effets présynaptiques.

d) Aussi bien l'ACh injectée que le médiateur naturel déterminent une dépolarisation de la membrane postsynaptique.

Nos expériences apparaissent centrées avant tout sur les critères n° 5 et 6. Ils correspondent approximativement aux critères n° 7 et 8 de WERMAN (1966) relatifs à " l'identité d'actions physiologiques " entre la substance candidate-médiateur et le transmetteur naturel. Selon WERMAN (1966), le critère "d'identité d'actions" est en fait le critère de base, fondamental pour toute identification, la substance candidate devant mimer autant que possible le médiateur naturel. Son importance serait telle, que celle accordée aux autres critères devrait résulter des renseignements fournis dans un premier temps par celui-là.

Ces deux critères ne peuvent être pleinement remplis que si leur exigence première, le contrôle à l'échelon unitaire, est tout d'abord satisfait. Les expériences que nous avons réalisées ont toutes eu pour objet la même fibre postsynaptique ce qui autorise et facilite la comparaison des résultats. Cela a été possible grâce à la technique de l'oil-gap sur fibre isolée. Cette technique, couplée avec l'application ionophorétique de la substance candidate-médiateur, constitue l'ensemble susceptible de fournir les renseignements les

plus sûrs et les plus précis. En particulier, cet enregistrement unitaire permet de contrôler tous les phénomènes sous-liminaires postsynaptiques (dépolarisations faibles, hyperpolarisations, absence de changements de potentiel, variations relativement faibles de Rm). Ces possibilités constituent un réel progrès chez les Insectes et apportent des avantages importants eu égard aux données actuellement disponibles qui , en ce qui concerne le système des fibres géantes, ont été obtenues sur le ganglion entier et par contrôle global sur les connectifs interganglionnaires.

Cependant ce progrès reste limité, essentiellement parce que nous avons travaillé au niveau neuropilaire, masse constituée par un mélange d'éléments divers (prolongements gliaux , membranes pré- et postsynaptiques, éléments dendritiques et axoniques ...). De ce fait, l'accessibilité des substances à la membrane interrogée se fait sans doute de façon discontinue, hétérogène. Les résultats obtenus sont souvent la résultante de multiples sites d'action, ce qui rend difficile l'extraction des effets uniquement postsynaptiques et l'établissement d'une comparaison avec ceux d'une membrane plus homogène (celle par exemple d'un corps cellulaire périphérique ou d'une fibre musculaire).

La technique d'injection ionophorétique permet en outre, en accédant directement au niveau des zones actives, de minimiser de manière importante le rôle de certaines barrières (par exemple la barrière cholinestérasique), mais elle ne permet pas d'éliminer totalement la multiplicité des sites d'action. Cela constitue une limite propre au système neuropilaire. Nous aurions pu injecter d'autres drogues par cette même méthode, en particulier les drogues antagonistes, mais nous n'aurions pas éliminé les défauts décrits ci-dessus, aussi avons-nous préféré les appliquer sur le ganglion entier. D'ailleurs, même dans les meilleures conditions, la technique ionophorétique appliquée au neuropile ne permet pas d'éliminer la possibilité d'une action unique et totale de la substance injectée sur les terminaisons présynaptiques. Dans ce cas , les effets observés postsynaptiquement seraient indirectement liés au médiateur qui pourrait être ainsi libéré. Dans le cas d'un circuit monosynaptique, ces éventuels effets sont en partie contrôlables soit postsynaptiquement, soit présynaptiquement par enregistrement de

l'activité antidromique qui pourrait en résulter. Si le circuit est polysynaptique, un contrôle direct sur ce circuit est impossible ; cependant on peut envisager qu'une substance qui agirait sur la membrane des interneurones impliqués dans le circuit polysynaptique agirait aussi sur les neurones afférents du circuit monosynaptique, qui lui est contrôlable.

A ce propos, les corps cellulaires périphériques de grande taille de certains Invertébrés constituent un cas intéressant permettant l'étude des propriétés pharmacologiques d'une membrane postsynaptique (la membrane somatique) sans l'intervention d'autres facteurs secondaires, essentiellement présynaptiques (il n'y a en effet aucun contact synaptique sur ces corps cellulaires). De telles études sont possibles chez les Invertébrés, par exemple chez l'Aplysie (GERSCHENFELD et TAUC, 1964; TAUC et GERSCHENFELD, 1961 et 1962) ou chez l'Escargot (KERKUT et WALKER, 1961; GERSCHENFELD et LASANSKY, 1964).

Chez les Insectes, les corps cellulaires sont aussi à la périphérie et dépourvus de synapses, mais malheureusement bien plus petits et de ce fait difficiles d'accès par la microélectrode. Cependant, certains d'entre eux (30 à 40 µm de diamètre), n'appartenant pas au système des fibres géantes de plus gros diamètre, présentent une certaine chémosensibilité à l'ACh (CALLEC et BOISTEL, 1967; KERKUT, PITMAN et WALKER, 1969 a et b; PITMAN et KERKUT, 1970). Cette sensibilité cholinergique peut être antagonisée par la gallamine (curarisant de synthèse) (CALLEC et BOISTEL, 1967; PITMAN et KERKUT, 1970).

En conclusion, les résultats que nous avons rapportés par nos expériences, rapprochés de ceux que nous avons rassemblés p. 70 concourent à renforcer considérablement l'hypothèse d'une transmission cholinergique entre les afférences excitatrices et la fibre géante médio-ventrale (fibre II de HARRIS et SMYTH, 1971 b).

B - L'ACIDE γ- AMINO BUTYRIQUE (GABA) EST-IL MEDIATEUR CHIMIQUE CHEZ LA BLATTE ?

1 - Introduction .

Comme nous l'avons montré dans les chapitres précédents, les données relatives à l'intervention de l'ACh au niveau neuropilaire dans le ganglion A_6 de *Periplaneta americana*, sont relativement considérables. La participation éventuelle d'autres médiateurs à ce même niveau n'a jamais été abordée. Cependant, des travaux récents (KERKUT, PITMAN et WALKER, 1969 a et b; PITMAN et KERKUT, 1970) suggèrent fortement, en fonction de résultats acquis au niveau de certains corps cellulaires de ce même ganglion, que le GABA pourrait être un médiateur inhibiteur (voir les critères d'identification rassemblés ci-dessous).

Une question se pose : cet acide aminé peut-il également être considéré comme un médiateur des PPSIs observés au niveau du système des fibres géantes ? Le but de ce chapitre est de tenter de répondre à cette question. Comme il existe un parallèle évident entre ces deux chapitres sur l'ACh et le GABA, certains traits de discussion développés dans le premier ne seront pas repris dans le second, cela dans le but de limiter, dans une certaine mesure, les répétitions.

Les résultats acquis par KERKUT et ses collaborateurs sur certains corps cellulaires se rapportent aux critères d'identification suivants (classement de GERSCHENFELD, 1966).

- Critères de reconnaissance d'une synapse chimique:

1c = Existence d'un potentiel d'inversion pour certains PPSIs.

- Critères d'identification d'une substance médiatrice:

5b = Blocage de l'action du médiateur par un antagoniste du GABA, la picrotoxine.

5c = Effets hyperpolarisants dus à des microinjections de GABA .

6a = Changements de perméabilité ionique vraisemblablement similaires (Cl^- et K^+) pour le PPSI et le GABA.

6b = Potentiels d'inversion similaires: GABA : - 75,4 $\pm$ 0,6 mV
PPSI : - 78,9 $\pm$ 2,1 mV.

6d = Changements de potentiel membranaire similaires, dans le sens d'une hyperpolarisation .

- Autres critères abordés chez *Periplaneta americana* (système nerveux, *lato sensu*):

1d = Présence de GABA dans la chaîne nerveuse ventrale (RAY, 1964 et 1965) .

2d = Présence d'une enzyme de synthèse (décarboxylase de l'acide glutamique, GAD) dans les ganglions thoraciques (OLIVER, TABERNER, RICK et KERKUT, 1971). Voir aussi tableau IV.

2 - Résultats.

a - Injection ionophorétique de GABA.

Dans de telles expériences, les problèmes techniques sont tout à fait comparables à ceux que nous avons rencontrés pour l'injection d'ACh. Les microinjections sont pratiquées dans l'étendue présumée de l'arbre dendritique de la fibre II et les zones actives sont repérées grâce aux effets postsynaptiques (variations du potentiel de membrane , de Rm ou du PPSE).

Les effets observés sur le potentiel de membrane sont toujours faibles, parfois imperceptibles. Lorsqu'ils sont visibles, ils se présentent sous forme d'une hyperpolarisation dont l'amplitude s'accroît avec l'intensité du courant d'injection (fig. 97) (1).

(1) Nous avons parfois utilisé des électrodes à double canaux, l'un contenant de l'ACh, l'autre du GABA. A plusieurs reprises, l'injection de ces deux substances, au même endroit, dans le ganglion, a développé des effets identiques à ceux obtenus séparément par des microélectrodes simples. Ainsi, on peut penser que les récepteurs au GABA et à l'ACh ne sont pas très éloignés les uns des autres.

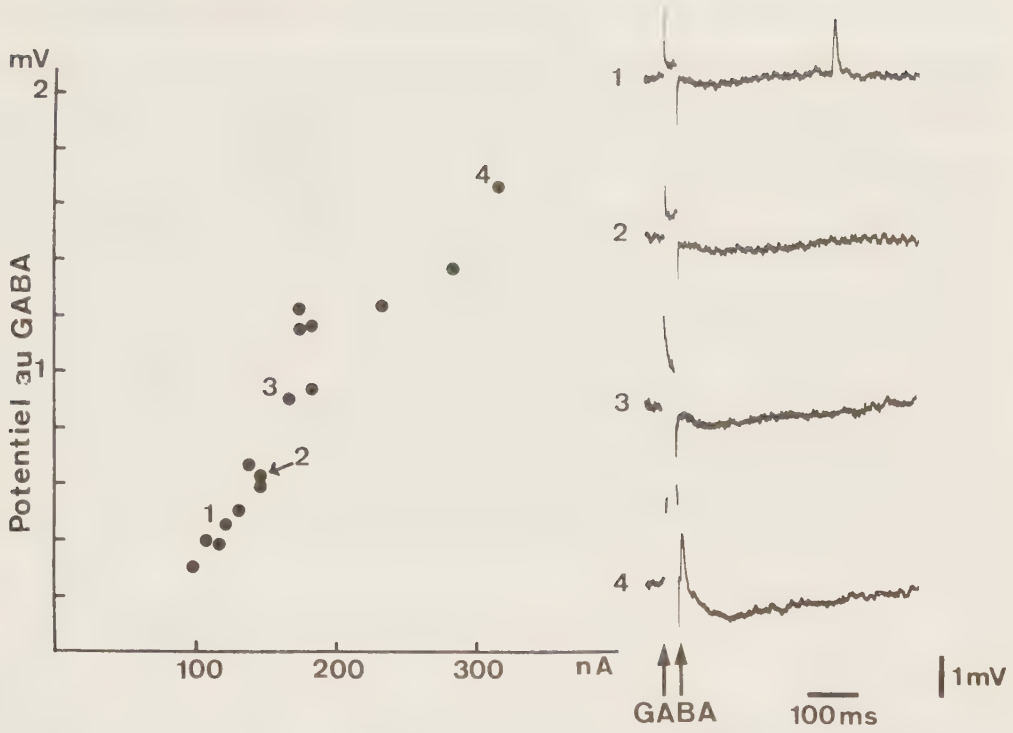


Fig. 97 - Injection ionophorétique de GABA. Relations entre l'intensité du courant et l'amplitude de la réponse hyperpolarisante obtenue. Les enregistrements sélectionnés sont marqués dans la courbe par un point chiffré.

Durant la phase d'action du GABA, nous observons une diminution plus ou moins prononcée des PPSEs monosynaptique et retardé (fig.98). Un courant en sens contraire n' a aucun effet (fig. 98, photo n° 3). Souvent,l'action maximum du GABA se situe assez longtemps après la fin du passage du courant (fig. 98, tracés n° 4 et 5), ce qui peut s'expliquer par l'existence d'un temps de diffusion amenant le GABA au niveau de sites plus ou moins éloignés. Parallèlement à cet effet dépressif sur le PPSE, nous observons une diminution nette de Rm, qui peut atteindre 20 à 30 % (fig. 98, tracé n°6). Si le PPSE est suffisant pour déclencher un potentiel d'action, ce dernier est bloqué pendant toute la phase d'action du GABA (fig. 98, tracé n°4). Ce relèvement du seuil peut être considéré comme une inhibition transitoire. Pour expliquer, d'une part les difficultés rencontrées pour obtenir une nette hyperpolarisation et d'autre part, les effets plus tardifs que ceux dus à l'ACh, on peut invoquer que les récepteurs postsynaptiques au GABA seraient moins nombreux ou moins dispersés que les récepteurs cholinergiques.

Il se pourrait également qu'ils soient rassemblés essentiellement en une région que nous n'aurions pas pu localiser exactement. Il est également possible que le potentiel de membrane soit, dans les zones d'injection du GABA, très voisin du potentiel d'inversion, potentiel qui peut être supposé proche de celui des PPSIs. Ces expériences montrent néanmoins que la membrane de la fibre géante II présente certaines zones sensibles au GABA, et qui répondent par une diminution de Rm, du PPSE et dans certains cas particulièrement favorables, par une hyperpolarisation. En aucun cas, nous n'avons pu faire une mesure du potentiel d'inversion du GABA. Devant ces difficultés nous avons voulu voir si le GABA appliqué en perfusion sur le ganglion entier avait des effets plus constants, en particulier sur le potentiel de membrane.

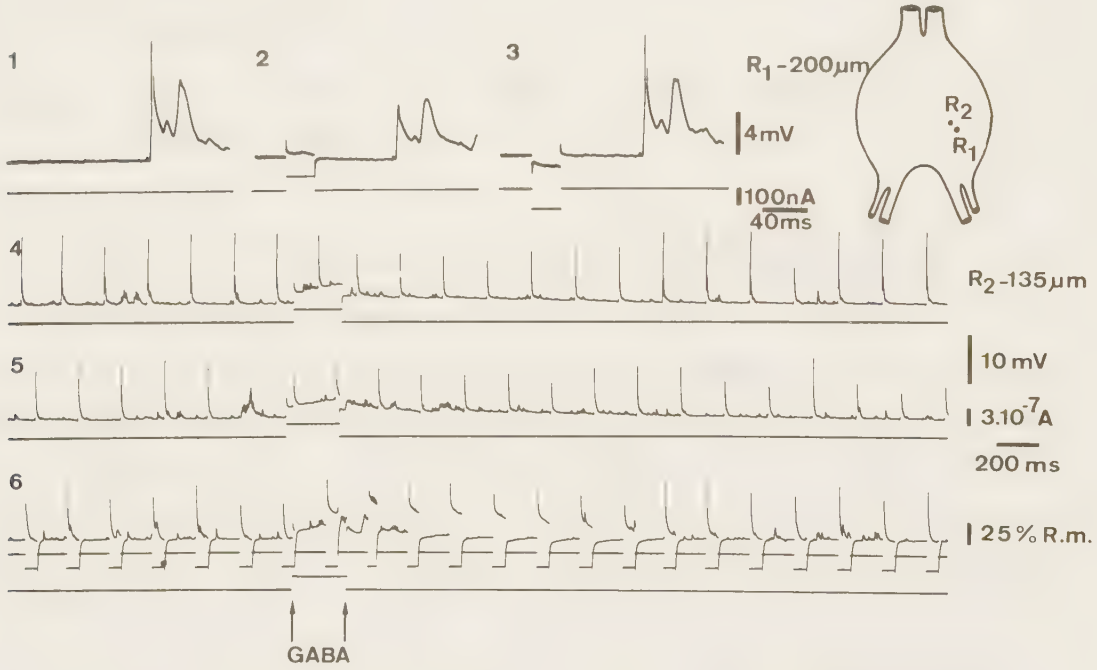


Fig. 98 - Injection ionophorétique de GABA. Effets sur les PPSEs, le potentiel de membrane et la résistance membranaire (Rm).

- Photos 1, 2, 3: Action du GABA sur les PPSEs monosynaptique et retardé; en 2, les PPSEs précédés par une injection de GABA effectuée en R_1, à 200 µm de profondeur, subissent une réduction de leur amplitude, qui devient insuffisante pour donner naissance à un potentiel d'action. On peut également observer une légère hyperpolarisation. Le courant dont le sens a été inversé (photo n° 3) est sans effet.

- Tracés 4, 5, 6: L'injection de GABA en R_2 à 135 µm de profondeur est suivie par une période d'inhibition, au cours de laquelle, le potentiel d'action obtenu par stimulation répétitive (5/s) du nerf XI est bloqué (tracé n°4) et le PPSE monosynaptique diminue d'amplitude (tracé n°5). Noter que le maximum d'action se situe après la fin de l'injection du GABA. Elle est accompagnée par une réduction de Rm (tracé n°6) qui se remarque par un déséquilibre du pont de Wheatstone au cours de l'application de chocs rectangulaires répétitifs (voir fig. 18 B).

b - Action du GABA sur le ganglion A_6 entier dégainé.

L'action du GABA dans ces conditions n'est nettement visible que pour une concentration élevée, excédant souvent 10^{-3} g/ml. Dans tous les cas, nous observons une hyperpolarisation faible (1 à 3 mV) qui se maintient constante pendant toute la durée d'action (fig. 99). Parallèlement, Rm et l'amplitude du PPSE monosynaptique diminuent progressivement et se maintiennent bientôt à une valeur relativement stable; le PPSE peut même s'annuler. Pour une concentration importante (3.10^{-3} g/ml), Rm diminue de 25% à 40% (fig. 99 et 102), valeurs qui ne sont pas tellement plus élevées que celles obtenues par des microinjections (fig. 98), ce qui pourrait constituer un argument en faveur d'un nombre relativement restreint de récepteurs au GABA.

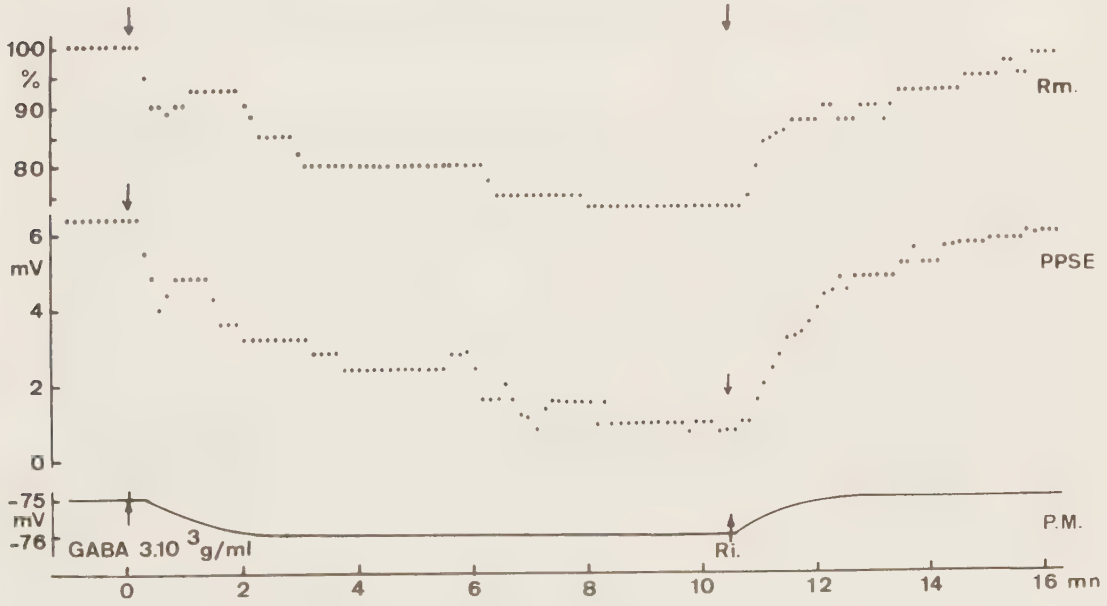


Fig. 99 - Effets du GABA sur le ganglion A_6 entier dégainé. Dès l'application du GABA, on observe une diminution de Rm et du PPSE ainsi qu'une hyperpolarisation (P.M.= potentiel de membrane). Dès le retour au liquide physiologique normal (Ri) ces divers effets s'estompent rapidement.

Les variations du PPSE et de Rm se font sensiblement dans le même rapport (courbes pratiquement parallèles) ce qui est conforme à un effet purement passif de Rm sur le PPSE. Autrement dit, l'action du GABA ne semble perturber ni la libération du médiateur excitateur ni son action sur la membrane postsynaptique. Comme pour l'ACh, de fortes concentrations en GABA sont

nécessaires dans le liquide de perfusion, pour déterminer des effets post-synaptiques suffisamment importants. Cela pose la question de la présence éventuelle d'une ou plusieurs barrières pour le GABA. La nature d'une telle barrière est totalement inconnue. L'enzyme GABA-aminotransférase n'a pas été mise en évidence dans ce ganglion et à notre connaissance, rien ne s'oppose à la diffusion libre de cet acide aminé dans le tissu nerveux.

c - Action d'une substance antagoniste: la picrotoxine.

Selon certains auteurs, la picrotoxine a un effet antagoniste du GABA. Elle déprimerait de manière non-compétitive l'accroissement de conductance produit par le GABA (TAKEUCHI et TAKEUCHI, 1969).

α - Action de la picrotoxine sur les PPSIs unitaires " spontanés ".

A des concentrations relativement faibles (5.10^{-7} à 5.10^{-6} g/ml), la picrotoxine diluée dans le liquide de perfusion déprime progressivement tous les PPSIs unitaires " spontanés ". Elle est sans action inhibitrice sur les PPSEs unitaires , sur lesquels elle aurait plutôt un léger effet facilitateur. Pour une concentration légèrement supérieure (10^{-5} g/ml), cette action peut aller jusqu'au blocage complet (5 premiers tracés de la fig.100).

Parallèlement à cette action sur les PPSIs, nous pouvons parfois observer de faibles variations du potentiel de membrane et toujours un accroissement de Rm de l'ordre de 10 %. GRUNDFEST, REUBEN et RICKLES (1959) ont également noté une telle augmentation de Rm sur la fibre musculaire de l'Ecrevisse. Elle peut expliquer les effets sur les PPSEs, effets qui sont vraisemblablement passifs et dus aux variations des caractéristiques électriques de la membrane. Si nous laissons l'action de la picrotoxine se poursuivre , le nombre de PPSEs unitaires augmente, tout d'abord sous forme de PPSEs isolés, puis sous forme de dépolarisations de plus en plus amples et longues (fig. 100, tracés n° 4, 5, 6) capables parfois d'engendrer des potentiels d'action propagés (fig. 100, tracé n° 7). L'enregistrement simultané pré- et postsynaptique révèle que cette activité postsynaptique parfois très dense est accompagnée de potentiels d'action antidromiques sur les nerfs cercaux afférents. Il semble donc que la picrotoxine ait une importante

action sur les terminaisons présynaptiques excitatrices. Ces effets ne sont que rarement observables pour des concentrations voisines de 5.10^{-7} g/ml, alors que les PPSIs subissent une nette diminution; cependant ils se développent dans ce cas plus lentement. La réversibilité d'action de la picrotoxine est longue mais n'est pas toujours totale .

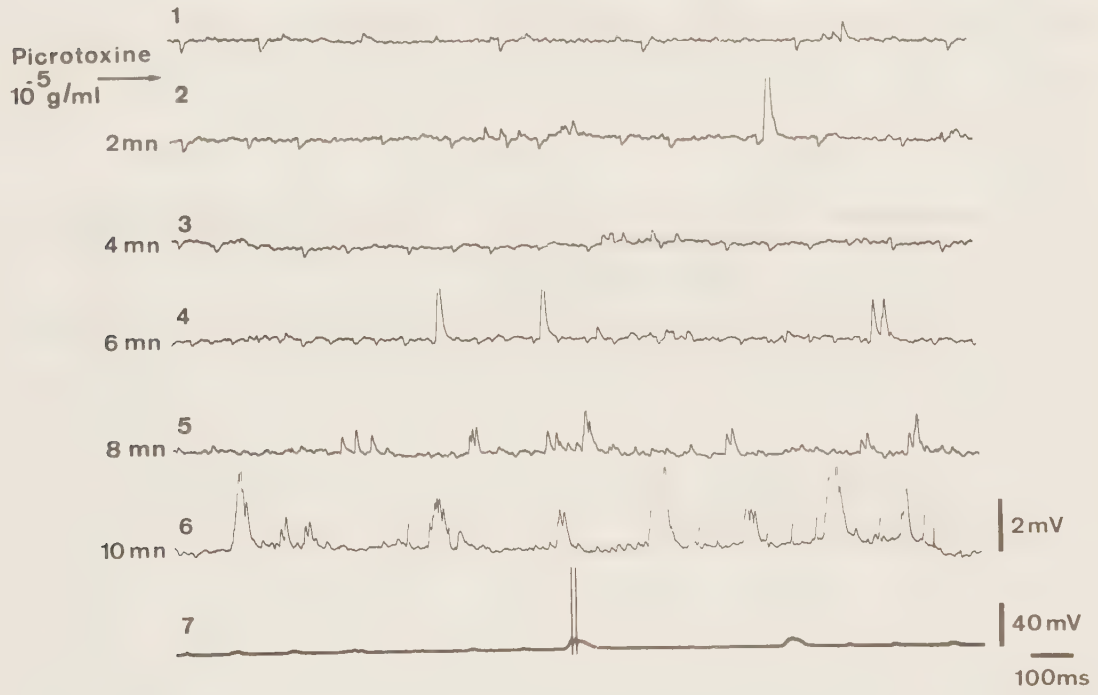


Fig. 100 - Effets de la picrotoxine sur des PPSIs unitaires " spontanés ". Noter que parallèlement à la diminution progressive des PPSIs, apparaissent des PPSEs "spontanés" de plus en plus nombreux, se sommant en dépolarisations capables d'engendrer parfois des potentiels d'action (tracé n° 7).

β - Action de la picrotoxine sur les PPSIs " unitaires " évoqués.

Les PPSIs unitaires déclenchés par la stimulation mécanique de récepteurs cercaux non identifiés décroissent également progressivement en amplitude et peuvent s'annuler complètement (fig. 101). Dans la fig.101, le potentiel d'action présynaptique est utilisé pour déclencher le balayage de l'oscilloscope. La réversibilité est dans ce cas totale. Les PPSEs "spontanés" dus à l'action de la picrotoxine sont peu visibles compte-tenu de la vitesse de balayage utilisée.

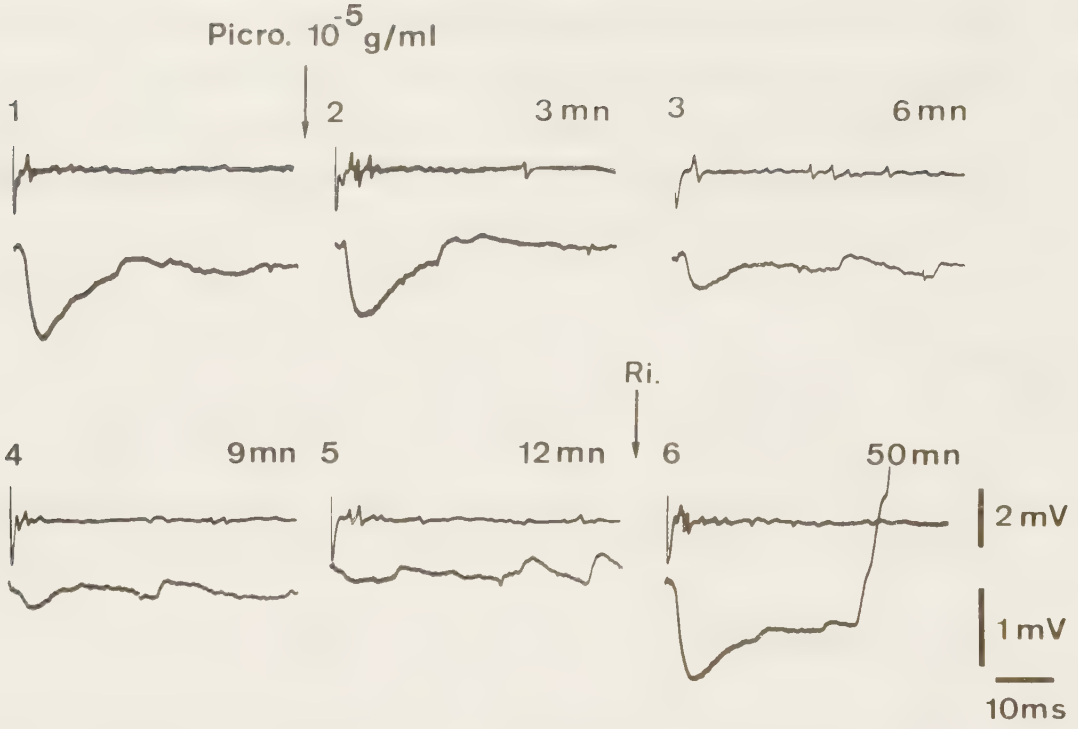


Fig. 101 - Effets de la picrotoxine sur un PPSI " unitaire " déclenché par la stimulation mécanique cercale. Le potentiel d'action présynaptique enregistré par électrodes externes sur le nerf X est utilisé pour déclencher le balayage de l'oscilloscope. Ri: retour au liquide physiologique normal.

V - Action de la picrotoxine sur les PPSIs évoqués.

Les PPSIs obtenus par la stimulation électrique des nerfs cercaux X sont également sujets à un blocage progressif en présence de picrotoxine, variable selon la concentration et le temps d'exposition. Cette action est particulièrement nette dans la fig. 102 où l'on voit le PPSI greffé sur un PPSE déjà existant (potentiel composite) diminuer d'amplitude et laisser apparaître progressivement le PPSE sous-jacent (tracés 1, 2, 3, 4, 5).

En résumé la picrotoxine a une action inhibitrice très importante et très spécifique sur tous les PPSIs de la fibre géante II. Cela renforce considérablement l'idée d'un médiateur unique pour les PPSIs unitaires " spontanés " ou évoqués par la stimulation mécanique, ainsi que pour les PPSIs évoqués globaux, autrement dit pour toutes les afférences inhibitrices; ce médiateur serait différent de l'ACh et pourrait être le GABA. Si la picrotoxine a bien un effet antagoniste du GABA , elle doit pouvoir supprimer les effets de cet acide aminé sur la membrane postsynaptique.

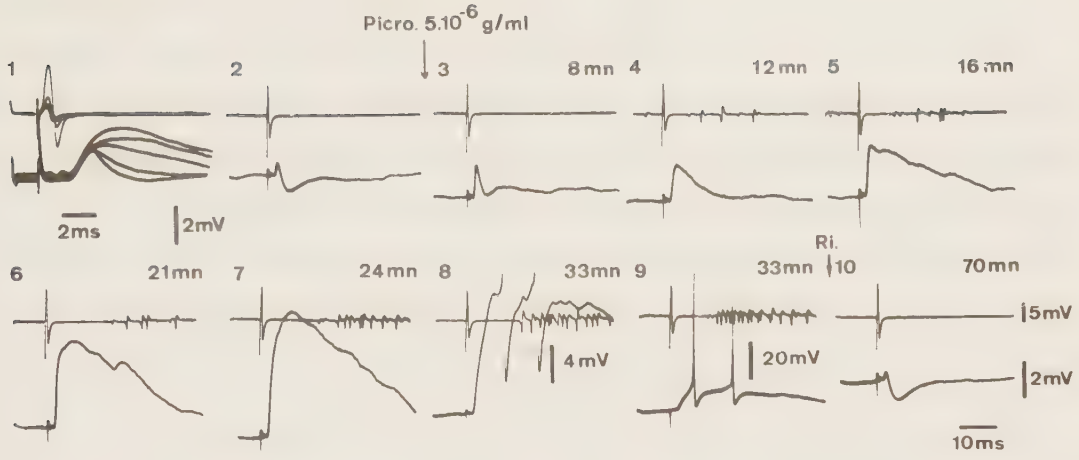


Fig. 102 - Effets de la picrotoxine sur le PPS composite déclenché par la stimulation du nerf X homolatéral. En 1, sont représentés plusieurs enregistrements superposés, au cours de stimulations croissantes. Le PPSE monosynaptique possède le seuil le moins élevé. Le PPSI évoqué se greffe approximativement à mi-parcours de sa phase de montée. Tracés du haut: potentiels d'action enregistrés sur le nerf X; noter le développement progressif de bouffées de potentiels antidromiques (ils se présentent sous forme de potentiels biphasiques inversés par rapport au potentiel orthodromique induit par la stimulation électrique).
Les photos n° 8 et 9 sont prises à quelques secondes d'intervalle, à des sensibilités différentes, et montrent l'apparition de potentiels d'action. Ri: retour au liquide physiologique normal.

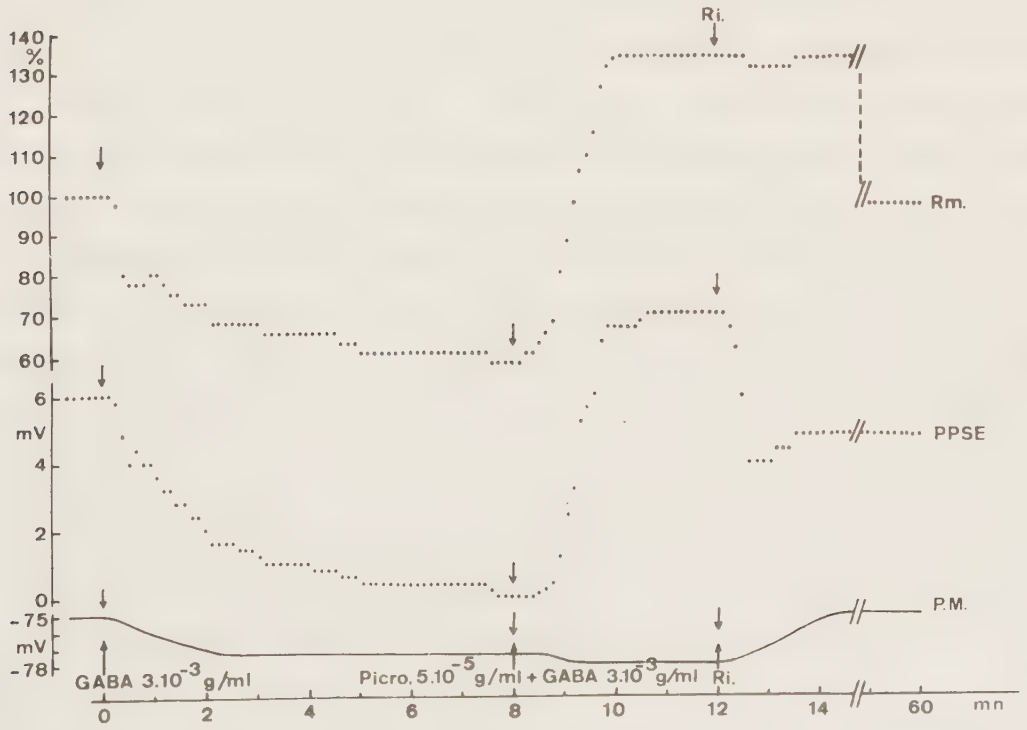


Fig. 103 - Effets de la picrotoxine au cours de l'action du GABA sur le ganglion A_6 dégainé. La picrotoxine contrebalance rapidement l'action du GABA et introduit ses propres effets sur Rm et conjointement sur le PPSE. P.M.= potentiel de membrane. Ri : retour au liquide physiologique normal.

L'expérience illustrée par la fig.103 montre que si l'on ajoute de la picrotoxine au cours de l'action du GABA, on supprime immédiatement, même lorsque le GABA est à forte concentration (3.10^{-3} g/ml), ses effets sur Rm et sur le PPSE déclenché par le nerf XI homolatéral. Par contre le potentiel de membrane a plutôt tendance à augmenter (légère hyperpolarisation). L'action particulière de la picrotoxine sur Rm est manifeste puisqu'elle surpasse la valeur de départ de 35 % environ. Le PPSE s'accroît pendant ce temps de 2,5 mV (il passe de 6 à 8,5 mV). Cette expérience confirme donc l'effet antagoniste de la picrotoxine sur le GABA.

δ - Action présynaptique de la picrotoxine.

La fig.102 révèle également que si l'action de la picrotoxine se poursuit après blocage du PPSI, le PPSE sous-jacent s'accroît considérablement en amplitude (3 à 4 fois plus) et en durée (environ 100 ms). Il peut même donner naissance à des potentiels d'action propagés (voir tracés n°8 et 9 pris au même moment à des sensibilités différentes). On peut également observer sur cette même figure des volées de potentiels d'action antidromiques sur le nerf afférent X (tracés du haut), volées qui sont liées à la stimulation électrique de ce même nerf. La genèse de ces potentiels ne peut avoir lieu qu'au niveau des fibres afférentes présynaptiques, vraisemblablement dans les terminaisons cercales. Elle ne peut s'expliquer que par une action particulière de la picrotoxine sur ces terminaisons. Elle agirait soit en dépolarisant des terminaisons, soit en permettant le développement important de potentiels consécutifs négatifs de longue durée (RIKER et OKAMOTO, 1969). Dans le deuxième cas, ils succéderaient à un potentiel d'action présynaptique et pourraient donner naissance à une salve de potentiels d'action. Cependant cette dépolarisation aurait pour contre-effet de diminuer l'amplitude des potentiels d'action présynaptiques et conjointement, la quantité de médiateur excitateur libéré (le médiateur inhibiteur et les PPSIs restant sans effet en présence de picrotoxine), ce qui tendrait à s'opposer à l'amplification des PPSEs.

L'augmentation de Rm, et l'action en retour sur la membrane postsynaptique des volées de potentiels d'action présynaptiques déclenchés par la picrotoxine, ne peuvent expliquer seules l'accroissement important du PPSE (300 à 400 %). En effet, Rm n'augmente, dans cet exemple, que de 10 %, or

dans celui décrit fig. 103, un accroissement de Rm de 35 % se traduisait sur le PPSE par seulement 40 % d'augmentation. D'autre part, les potentiels d'action antidromiques n'interviennent qu'une dizaine de millisecondes après le niveau maximum du PPSE. Cette valeur de 10 ms est bien supérieure au seul délai de conduction (vitesse de propagation dans les fibres cercales, 1,5 m/s et distance parcourue, au maximum 1 mm), ce qui permet de placer leur intervention plus tardivement.

On peut en déduire que pour expliquer une telle augmentation du PPSE, il est possible de supposer un mécanisme de levée d'inhibition. Cette inhibition pourrait être transmise par le GABA (puisqu'elle est bloquée par la picrotoxine) et s'exercerait présynaptiquement par des collatérales issues de certaines fibres composant le nerf X ou appartenant à des interneurones mis en jeu par ces mêmes fibres. Il s'agirait alors d'un mécanisme d'inhibition hétérosynaptique qui s'exercerait par le GABA sur les terminaisons présynaptiques cercales excitatrices. Un tel mécanisme a déjà été démontré à la synapse neuromusculaire de l' Ecrevisse ou la similarité des effets inhibiteurs postsynaptiques dus à la stimulation nerveuse et au GABA a été étendue aux terminaisons nerveuses présynaptiques excitatrices (DUDEL, 1962; TAKEUCHI et TAKEUCHI, 1966 a et b; 1969).

3 - Discussion .

Le GABA, quelque soit la technique utilisée (perfusion du ganglion entier ou injection ionophorétique) détermine des effets sensiblement identiques au niveau de la membrane postsynaptique de la fibre géante II. Le potentiel de membrane subit peu de modifications, sinon une légère hyperpolarisation, et la résistance membranaire Rm diminue de 20 à 40 % entraînant des répercussions parallèles sur l'amplitude des PPSEs. Autrement dit, le GABA a un effet inhibiteur. Malgré une variation relativement importante de la conductance, le potentiel de membrane tend à se maintenir au voisinage de son niveau de repos. Cela ne peut se concevoir que si le potentiel d'inversion est voisin du potentiel de repos, en particulier s'il produit un déplacement dans une direction légèrement hyperpolarisante. Les effets du GABA peuvent par conséquent être rapprochés de ceux des PPSIs.

Des effets comparables ont été enregistrés sous l'action du GABA, dans le cas d'autres structures et notamment à jonction neuromusculaire d'Invertébrés tels que les Crustacés (BOISTEL et FATT, 1958; DUDEL, 1965 b; GRUNDFEST, REUBEN et RICKLES, 1959; TAKEUCHI et TAKEUCHI, 1965, 1966 a et b; VAN DER KLOOT et ROBBINS, 1959), les Insectes (USHERWOOD et GRUNDFEST, 1965) ou même le Ver de terre (HIDAKA, ITO, KURIYAMA et TASHIRO, 1969; ITO, KURIYAMA et TASHIRO, 1969). C'est peut-être à la synapse neuromusculaire de l'Ecrevisse que se rassemblent les critères les plus nombreux en faveur d'une transmission par le GABA. Par contre, dans le système nerveux central, le GABA en tant que médiateur n'est pas l'objet d'une opinion unanime de la part des chercheurs. Il présente cependant des effets sensibles chez les Invertébrés tels que l'Ecrevisse (FURSHPAN et POTTER, 1959; OCHI, 1969) ou chez les Vertébrés, par exemple sur certains neurones de la moëlle (CURTIS, PHILLIS et WATKINS, 1959; CURTIS, HÖSLI, JOHNSTON et JOHNSTON, 1968), les cellules de Purkinje (KAWAMURA et PROVINI, 1970) les cellules du noyau de Deiters (OBATA, ITO, OCHI et SATO, 1967; CURTIS, DUGGAN et FELIX, 1970; TEN BRUGGENCATE et ENGBERG, 1971) ou le cortex cérébral (KRNJEVIC et SCHWARTZ, 1966 a et b, 1967).

Nous avons observé chez la Blatte que la picrotoxine antagonise à la fois les PPSIs et les effets dus à l'application du GABA. Par contre, elle n'a aucun effet dépresseur sur les PPSEs, qu'elle tend même à amplifier. Nous avons d'ailleurs admis que cette amplification peut tout simplement s'expliquer par l'augmentation concomitante de Rm. Or, selon de nombreux auteurs, la picrotoxine aurait un effet inhibiteur spécifique des synapses au GABA, en particulier chez les Invertébrés, pour les synapses neuromusculaires inhibitrices des Crustacés (ELLIOTT et FLOREY, 1956; ROBBINS et VAN DER KLOOT, 1958; ROBBINS, 1959; VAN DER KLOOT et ROBBINS, 1959; GRUNDFEST, REUBEN et RICKLES, 1959; KUFFLER, 1960; VAN DER KLOOT, 1960; TAKEUCHI et TAKEUCHI, 1969) ou des Insectes (USHERWOOD et GRUNDFEST, 1965) et plus rarement chez les Vertébrés (GALINDO, 1969; ENGBERG et THALLER, 1970; TEN BRUGGENCATE et ENGBERG, 1971). TAKEUCHI et TAKEUCHI (1969) ont pu montrer que la picrotoxine déprime l'augmentation de conductance due au GABA d'une manière non compétitive et ont proposé

qu'une molécule de picrotoxine se fixerait sur un site spécifique du récepteur au GABA(1).

Sachant que : - d'une part, dans nos expériences, la picrotoxine a un effet extrêmement net, à des doses faibles, aussi bien sur les PPSIs que sur les effets du GABA et que

- d'autre part cette drogue est reconnue comme un antagoniste spécifique des récepteurs au GABA, il est logique d'avancer l'hypothèse que le GABA pourrait être le médiateur de toutes les influences inhibitrices de la fibre géante II.

De nombreux autres acides aminés ont une certaine action inhibitrice ou excitatrice sur diverses préparations (voir EDWARDS et KUFFLER, 1959 et CURTIS et WATKINS, 1965). EDWARDS et KUFFLER (1959) ont montré en particulier que sur le récepteur à l'étirement de l'Ecrevisse, en ce qui concerne les agents inhibiteurs, les groupements terminaux NH_2 et COOH sont essentiels et que l'effet est optimal s'il sont séparés par 3 carbones (c'est le cas du GABA). Il serait néanmoins intéressant chez la Blatte de tester l'action de certains de ces acides aminés à chaîne carbonée plus simple (glycine , β - alanine) ou plus complexe (par exemple taurine , acides glutamique, aspartique, cystéique ...) (2)afin de cerner de plus près la formule chimique d'un composé qui offrirait éventuellement des effets plus importants que le GABA. GAHERY et BOISTEL (1965) ont montré par exemple que si la β- alanine (5.10^{-3} g/ml) a des effets dépresseurs sur l'activité

(1) Récemment, FELTZ (1971) a montré que l'acide β - guanidino-propionique , qui a un rôle agoniste du GABA sur les récepteurs à l'étirement des Ecrevisses *Orconectes virilis* et *Procambarus alleni* (EDWARDS et KUFFLER, 1959)*, a par contre un effet antagoniste compétitif à la synapse neuromusculaire de l'Ecrevisse *Astacus leptodactylus* .

(2) Notons à ce sujet que de nombreux arguments militent en faveur d'un rôle inhibiteur de la glycine dans la moëlle de Mammifères (voir WERMAN, DAVIDOFF et APRISON, 1968 ; CURTIS, HÖSLI, JOHNSTON et JOHNSTON, 1968). La strychnine pourrait être l'un de ses antagonistes (CURTIS, 1970) ainsi que la picrotoxine (DAVIDOFF et APRISON, 1969). D'autre part,l'acide glutamique peut avoir un effet excitateur et il est actuellement un sérieux candidat comme médiateur excitateur à la synapse neuromusculaire des Insectes (USHERWOOD et MACHILI, 1966 et 1968; KERKUT, SHAPIRA et WALKER, 1965).

afférente du ganglion A_6 comparables à ceux du GABA, l'acide α - amino-β - oxybutyrique n'a aucun effet. Nous avons réalisé quelques expériences qui ont révélé que la glycine (10^{-3} g/ml) et l'acide L - glutamique (10^{-4} g/ml) n'ont aucun effet notable sur la fibre géante II et sur la transmission.

Nous préférons retenir le GABA comme candidat inhibiteur compte-tenu essentiellement de sa présence dans la chaîne ventrale de *Periplaneta americana* , de ses effets sur la membrane de la fibre géante II (hyperpolarisation, diminution de Rm)et du fait qu'il est antagonisé par la picrotoxine, drogue qui jusqu'à preuve du contraire peut être considérée comme un antagoniste spécifique.

4 - Conclusion partielle.

Rassemblons les éléments que nous avons apportés par nos expériences et qui peuvent être retenus comme critères d'identification du médiateur inhibiteur dans le cadre du système " fibres cercales- fibres géantes ".

- Critères de reconnaissance d'une synapse chimique.

n°1 - Physiologiques :

a - Comme les PPSEs, les PPSIs sont parfois précédés d'un petit potentiel électrotonique (fig.41) assurant un couplage nettement insuffisant pour une transmission de type électrique.

c - Les PPSIs s'inversent toujours pour une hyperpolarisation de quelques mV. Le potentiel d'inversion est voisin de -80 mV (voir fig.44 et 45).

- Critères d'identification d'une substance comme médiateur chimique:

n°5 - Existence de récepteurs au GABA dans la membrane postsynaptique :

b - La transmission,de même que les potentiels au GABA,sont bloqués par la picrotoxine. Nous avons admis que la picrotoxine a également un effet présynaptique.

c - La microinjection de GABA sur la membrane de la fibre post-synaptique entraîne une diminution de la résistance Rm (fig. 98) et quelquefois une hyperpolarisation (fig. 97).

n°6 - Identité d'actions physiologiques de la substance et du médiateur naturel:

c - Le GABA diminue la résistance membranaire (fig. 98).

d - Aussi bien le GABA que le médiateur naturel déterminent une hyperpolarisation de la membrane postsynaptique (fig. 27, 30, 40 et 97).

Ces faits ajoutés à ceux que nous avons rassemblés au début de ce chapitre concourent à appuyer une transmission par le GABA dans le ganglion A_6 de *Periplaneta americana* et en particulier entre les afférences cercales inhibitrices et la fibre géante II.

Conclusions générales et perspectives d'avenir

Etant donné que nous avons affecté chaque chapitre, parfois même certains sous-chapitres d'une conclusion particulière, il ne nous paraît pas utile d'y revenir en détails. Nous allons plutôt tenter de placer notre étude dans un cadre plus général, de préciser son apport à la connaissance du système nerveux central chez les Insectes, voire du système nerveux en général et de terminer par les perspectives d'avenir et les prolongements qu'on peut en attendre .

LE SYSTÈME "FIBRES CERCALES-FIBRES GÉANTES II" CENTRE INTÉGRATEUR

Nos enregistrements effectués, dans différentes conditions expérimentales, sur un seul axone géant associé à l'activité des fibres cercales, nous ont permis de dégager une vue d'ensemble relativement complète et précise des connexions synaptiques et de leurs propriétés intégratrices.
Les connexions possibles entre la fibre géante médio-ventrale (fibre II) et les principales afférences que nous avons identifiées sont synthétisées dans la fig. 104 (1). Ce diagramme a été élaboré en tenant compte de nos propres résultats électrophysiologiques et pharmacologiques et des récentes données

(1) Nous devons remarquer ici que ce schéma présente de nombreux points de comparaison avec celui élaboré récemment par HOYLE (1970) pour un motoneurone d'Insecte.

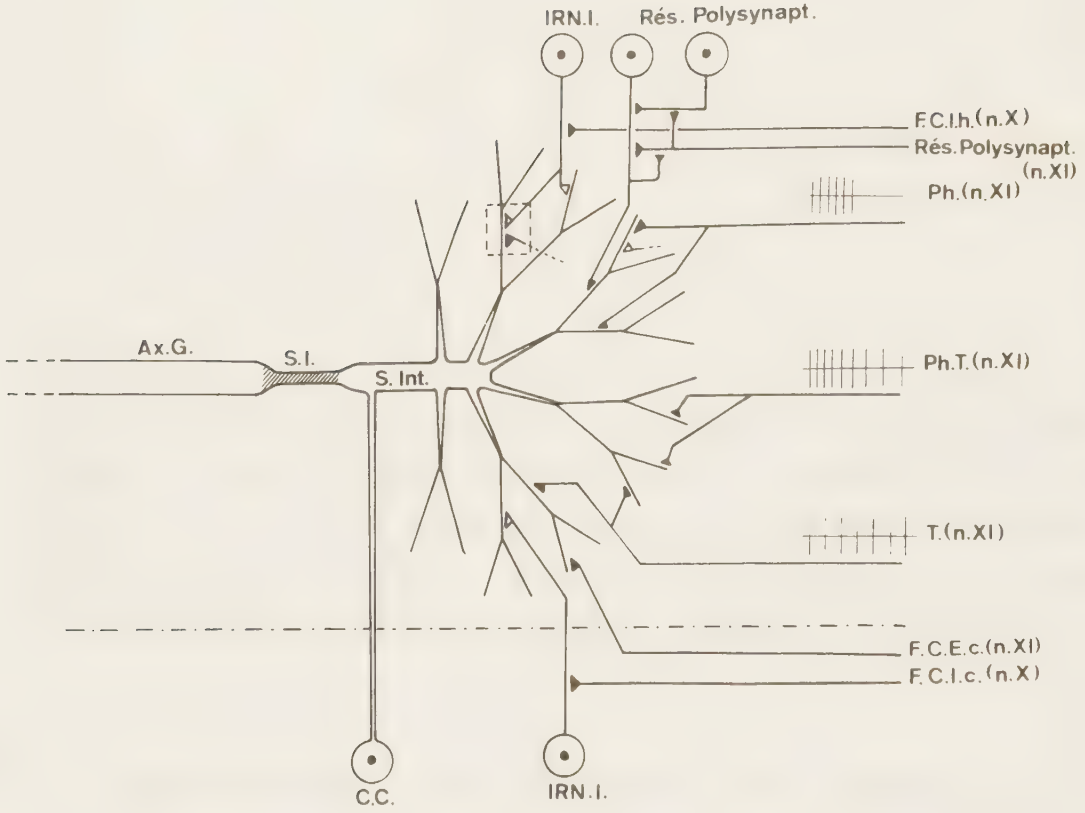


Fig. 104 - Représentation schématique de la région synaptique d'un neurone géant (fibre géante II) au niveau du ganglion A_6 de *Periplaneta americana*. Les principales catégories d'afférences sont représentées; elles sont toutes supposées avoir leurs contacts synaptiques seulement sur les branches les plus fines de l'arbre dendritique. Le site d'initiation des influx (S.I.) pourrait se situer à la sortie du segment intégrateur (S.Int.). Les branches dendritiques les plus grosses sont susceptibles d'engendrer des potentiels d'action non-propagés.
Ax.G.: axone géant; C.C.:corps cellulaire contralatéral. IRN.I. :interneurone inhibiteur; F.C.I.h.;F.C.I.c.: fibres cercales inhibitrices homo- ou contralatérales. F.C.E.c.: fibre cercale excitatrice contralatérale. Ph., Ph.T.,T. : afférences excitatrices consistant en volées de potentiels d'action résultant de la stimulation de mécanorécepteurs respectivement phasiques, phasico-toniques et "toniques". Rés. polysynapt.: réseau d'interneurones polysynaptiques agencés pour tenter d'expliquer les PPSEs retardés ou les circuits en boucles. Encarté dans un rectangle pointillé : deux sites synaptiques voisins, l'un inhibiteur (triangle ouvert) et l'autre excitateur (triangle noir). Ligne'point-trait": axe de symétrie du ganglion.

obtenues d'une part au microscope électronique par FARLEY et MILBURN (1969) et d'autre part à partir d'injections d'une substance fluorescente, le jaune procion (MILBURN et BENTLEY, 1971; HARRIS et SMYTH, 1971 b). Nous y avons rassemblé les détails les plus importants quant au fonctionnement d'un interneurone intégrateur chez la Blatte. Il n'est d'ailleurs pas impossible qu'il puisse servir de modèle et permettre une certaine généralisation chez les Insectes et peut-être même chez les Arthropodes.
Nous dirons successivement quelques mots sur la localisation des afférences, le rôle du corps cellulaire, le site d'initiation des influx, et le segment que nous avons appelé " intégrateur ".

1° Les diverses afférences excitatrices monosynaptiques, phasiques, phasico-toniques, toniques, de même que les afférences inhibitrices disynaptiques sont censées établir leurs contacts synaptiques seulement sur les branches les plus fines de l'arbre dendritique. Il n'est cependant pas exclu que certains contacts aient lieu notamment sur les branches dendritiques les plus grosses ainsi que sur le segment intégrateur.

2° Le corps cellulaire ne présente aucun contact synaptique . Il est relié au reste du neurone par un long filament neuronal extrêmement fin ce qui introduit certainement une constante de temps élevée et entraîne une atténuation importante des potentiels synaptiques. On peut par conséquent considérer que les potentiels qui l'envahissent sont faibles et qu'il serait inexcitable. Son rôle dans la transmission synaptique paraît donc, tout au moins pour les phénomènes à court et moyen terme, quasiment nul.

3° En quittant le segment intégrateur, la fibre géante se rétrécit considérablement. Nous pensons que cette zone constitue le lieu privilégié d'initiation des influx propagés. Nous possédons plusieurs éléments qui militent en sa faveur, dus principalement à des enregistrements par microélectrode capillaire.

Il est en effet possible de pénétrer les fibres géantes et de dériver des potentiels d'action de grande amplitude entre le départ des connectifs et approximativement le milieu du ganglion. Les difficultés de pénétration croissent au fur et à mesure qu'on s'éloigne des connectifs tandis que le potentiel d'action décroît. Au centre du ganglion, il n'a jamais été possible d'enregistrer des potentiels d'action avec " overshoot " (voir fig. 6).

Dans une région plus postérieure, la microélectrode pénètre plus aisément, il s'agit vraisemblablement du segment " intégrateur " élargi. Mais nous avons vu que cette région ne permet d'enregistrer que des petits potentiels d'action (25 à 35 mV) ce qui signifie sans doute qu'ils n'envahissent pas ce segment et subissent de ce fait une grande perte d'amplitude.

Tous les enregistrements par microélectrode montrent que l'apparition du potentiel d'action ne supprime pas le PPSE sous-jacent (voir les fig.6 et 7).

Ces diverses observations confirment que les sites des PPSEs et du potentiel d'action sont vraisemblablement séparés. Il est logique de placer le site d'initiation des influx au niveau du rétrécissement. C'est là en effet que la surface de membrane offerte aux courants provenant de l'activité synaptique est la plus faible. On peut cependant envisager d'accorder une certaine excitabilité aux branches dendritiques les plus grosses. Une telle hypothèse s'appuie sur l'enregistrement de potentiels d'action d'amplitude réduite (25 mV environ) observés au cours de la volée qui accompagne la dépolarisation de la fibre postsynaptique (après arrêt de l'oxygénation par exemple, fig. 61). De tels potentiels seraient alors bloqués au point de convergence des branches dendritiques, zone qui se dilate et offre une surface de membrane importante. Elle constitue ainsi une région dont le facteur de sécurité est faible. Un tel comportement rappelle des faits semblables observés chez l'Ecrevisse (PRESTON et KENNEDY, 1960) ou même sur le motoneurone de Chat (voir ECCLES, 1964). Cette zone dilatée (segment intégrateur) peut être assimilée, d'un point de vue purement fonctionnel, au soma d'un motoneurone de Chat .

4° Pourquoi a-t-on appelé " segment intégrateur " cette zone dilatée ? Il est tout d'abord nécessaire de raisonner à l'échelon du simple contact (voir fig. 104) ou plutôt de l'ensemble des contacts synaptiques appartenant à une seule et même fibre cercale qui peut être assimilée à l'unité basale fonctionnelle. L'arrivée du potentiel d'action présynaptique y engendre des microcourants, que l'on enregistre à distance sous la forme de PPSEs et PPSIs unitaires. Ils s'écoulent dans l'axoplasme, tout en subissant néanmoins quelque perte dans la résistance membranaire et atteignent le segment intégrateur et le site d'initiation des influx. Le retour se fait par les espaces extracellulaires et l'on peut considérer qu'ils n'affectent que très peu les branches dendritiques voisines. Nous avons vu que de tels courants,dus à l'action d'un seul potentiel d'action cercal,sont insuffisants pour engendrer un influx propagé. Par contre, lorsque plusieurs fibres cercales sont sollicitées, tous les microcourants ainsi développés convergent vers la même zone et se somment sub-algébriquement si les conditions temporelles sont respectées. La sommation débute d'ailleurs au niveau même de contacts synaptiques voisins. La zone de convergence est apparemment inexcitable ou présente tout au moins un seuil nettement plus élevé que celui du site d'initiation des influx. Elle est par conséquent parfaitement adaptée pour faire en permanence, dans les meilleures conditions, le bilan de toutes les influences aussi bien excitatrices qu'inhibitrices sans être perturbée par d'éventuels potentiels d'action. La sommation spatiale de toutes ces influences synaptiques se fait par conséquent essentiellement au niveau du segment intégrateur. Elle dépend avant tout des propriétés électriques de la membrane dendritique sur la propagation des potentiels unitaires entre les contacts synaptiques et la zone de convergence. Etant donné que nous avons montré que la transmission est de type chimique, nous pouvons ainsi dire avec KATZ (1966) que " les propriétés du cable conducteur ne sont pas impliquées dans la transmission des signaux au travers de ces synapses, bien qu'elles constituent, sans aucun doute, la base de l'intégration des messages locaux, une fois que ceux-ci ont été transférés à la cellule effectrice commune " .

D'après ce qui précède, il ne fait aucun doute que l'ensemble " fibres cercales - fibres géantes II " constitue un centre nerveux intégrateur. Peut-on cependant, comme nous l'avons suggéré en introduction, en faire un modèle ? Une réponse affirmative à cette question suppose que chaque élément de ce système puisse être parfaitement contrôlé. Nous avons déjà dit p.165 que cela est vrai dans une certaine mesure ; c'est le cas pour :

- les principales caractéristiques électriques de la fibre géante postsynaptique (résistance membranaire, potentiel de membrane, variations de potentiel);

- les afférences excitatrices dont le contrôle peut être effectué au niveau même des mécanorécepteurs qui leur donnent naissance;

- en outre certaines particularités lui apportent un intérêt supplémentaire . Nous mentionnerons notamment :

. la variété des mécanorécepteurs excitateurs ainsi que des phénomènes particuliers qui accompagnent leur activité (facilitation, dépression);

. la présence simultanée de nombreuses influences excitatrices monosynaptiques et inhibitrices vraisemblablement disynaptiques. Nous ne contrôlons encore qu'imparfaitement les afférences inhibitrices mais la recherche de la localisation précise des récepteurs cercaux impliqués devraient nous aider à y parvenir;

. la nature chimique de la transmission. Nous avons justifié au mieux le rôle intermédiaire de l'acétylcholine comme médiateur exclusivement excitateur et apporté des éléments en faveur du GABA comme médiateur inhibiteur.

La plupart des synapses centrales de Vertébrés et d'Invertébrés fonctionnent vraisemblablement selon le même modèle, c'est-à-dire que de multiples signaux, parfois antagonistes, convergent sur le même neurone. Les motoneurones spinaux de Mammifères sont certainement l'un des types les mieux étudiés (voir ECCLES, 1964). Les systèmes qu'ils constituent sont déjà d'une grande complexité, ce qui a amené les expérimentateurs à rechercher les processus élémentaires de fonctionnement sur des systèmes

relativement plus simples, notamment à la jonction neuromusculaire de Crustacé et plus précisément sur un muscle de la pince de l'Ecrevisse (WIERSMA, 1941; FATT et KATZ, 1953; DUDEL et KUFFLER, 1961). Cet exemple représente selon KATZ (1966) un modèle type de synapse intégratrice. Nous pensons, que dans le cas de la Blatte , le système " fibres cercales - fibres géantes ", rassemble les principaux traits de fonctionnement observés notamment dans le motoneurone de Chat ou à la synapse neuromusculaire de l'Ecrevisse et qu'il peut être considéré également comme un exemple de synapse intégratrice.

SIGNIFICATION COMPORTEMENTALE DE L'INTÉGRATION AU NIVEAU DU GANGLION A_6

On peut se demander quelle peut être la signification d'une telle capacité d'informations pour l'animal vivant, quand on sait qu'une bonne synchronisation de nombreuses afférences est nécessaire pour engendrer un ou deux potentiels d'action propagés dans une fibre géante.

Les récepteurs toniques sont des récepteurs de position. Nous avons dit qu'ils sont extrêmement sensibles. Ils sont continuellement stimulés par de légers souffles d'air, ainsi que par le moindre contact avec le support ou d'autres animaux ou même par des impuretés (poussières, excréments). Chez l'animal vivant, leur activité est certainement importante et donnerait lieu à une grande dépolarisation postsynaptique si elle n'était pas, en fait, minimisée par les phénomènes de dépression ou d'habituation. Il semble que ces récepteurs, excepté lorsqu'ils entrent en activité et à condition de fonctionner à haute fréquence, donnent essentiellement un tonus de base apte à assurer un niveau moyen d'excitabilité.

Les récepteurs phasiques, au contraire, sont des récepteurs de mouvement ; ils ne sont mis en jeu que lors d'un souffle d'air brusque et fort ou de contacts prononcés. Ils induisent des potentiels postsynaptiques qui peuvent être renforcés par la facilitation.

Dans ces conditions, la sommation des potentiels postsynaptiques n'est surtout favorable à la genèse d'un potentiel d'action propagé que pendant les brèves composantes initiales phasiques et toniques, tandis que de nombreux facteurs (dépression, habituation, hyperpolarisation post-tétanique) interviennent pour limiter le nombre de potentiels d'action. La synapse doit en outre demeurer au repos pendant un certain temps (1 à 3 mn) afin de pouvoir engendrer à nouveau d'autres potentiels d'action. Ces potentiels d'action sont rapidement conduits vers d'autres centres (ganglions thoraciques ou cérébroïdes) où ils semblent assurer le développement et le contrôle du réflexe de fuite.

Nous ferons un cas à part des influences inhibitrices. Les récepteurs " inhibiteurs " sont différents des premiers et semblent être plus particulièrement mis en activité lors du mouvement d'ensemble d'un cerque. Nous pouvons poser comme hypothèse de travail qu'il pourrait s'agir de propriocepteurs dont le rôle serait alors d'inhiber la fibre géante lorque les cerques sont en mouvement et que pendant ce temps les mécanorécepteurs deviendraient fonctionnellement moins efficaces.

APPORT DE NOTRE ÉTUDE A LA PHYSIOLOGIE NERVEUSE DES INSECTES

La synthèse bibliographique aussi complète que possible que nous avons faite au début de ce mémoire nous permet de mieux réaliser les progrès acquis.

Il ressort de notre étude que les principaux traits de fonctionnement des synapses centrales se retrouvent chez la Blatte et vraisemblablement d'une manière plus générale chez les Insectes.

Nous y avons retrouvé des phénomènes excitateurs (PPSEs) tout à fait classiques, et pour la première fois, de manière constante, des phénomènes inhibiteurs postsynaptiques (PPSIs). Il n'est pas impossible que les fibres cercales soient soumises à une certaine inhibition présynaptique; c'est ce qui semble ressortir indirectement de certaines expériences pharmacologiques (action de la picrotoxine). Ces potentiels sont très sensibles à certains

facteurs et la plupart d'entre eux appuient la nécessité d'un intermédiaire chimique; il s'agit de l'action particulièrement importante des ions Ca^{++} et Mg^{++} et de la stimulation répétitive. La stimulation répétitive opérée dans diverses conditions expérimentales a montré que la sommation des potentiels unitaires est accompagnée soit de facilitation, soit au contraire d'une dépression parfois importante, phénomènes qui se retrouvent dans bien d'autres synapses (voir chapitre II). Cependant, nous n'avons pas observé de facilitation ou d'inhibition hétérosynaptiques; tout au moins en ce qui concerne les potentiels monosynaptiques. FLOREY affirmait , en 1967 , que tous les neurones sensoriels d'Arthropodes contiennent de l'acétylcholine, ce qui ne serait pas le cas chez les Vertébrés. Nos expériences permettent de confirmer entièrement cette assertion. Nous avons en effet montré que tous les PPSEs unitaires sont sans doute monosynaptiques, qu'ils relèvent de l'activité des fibres sensorielles cercales et qu'ils seraient dus à l'action de l'acétylcholine. FLOREY admettait en outre que chez les Arthropodes tous les neurones inhibiteurs périphériques, dont les corps cellulaires sont dans les ganglions, agissent par le GABA et il étendait cela également aux neurones inhibiteurs centraux. Nos résultats confirment également cette hypothèse.

Nos résultats ne nous ont pas permis de dégager de nouveaux mécanismes synaptiques et il semble en fin de compte que, dans le règne animal, il existe une certaine homogénéité de fonctionnement synaptique compatible avec la remarquable uniformité ultrastructurale énoncée par ECCLES (1964).

PROLONGEMENTS DE NOTRE ÉTUDE ET PERSPECTIVES D'AVENIR

Le lecteur a pu remarquer que certains chapitres n'ont pas été l'objet d'un développement expérimental important. Nous avons en effet parfois préféré dégager les traits les plus caractéristiques afin d'en extraire une idée d'ensemble aussi complète que possible. Autrement dit, les recherches que nous avons exposées ne constituent parfois qu'une étape et il serait souhaitable, dans un deuxième temps, de les reprendre point par point et de les développer au maximum.

Nous citerons notamment:

- l'étude statistique de la sommation temporelle ou même spatiale de l'activité issue de diverses catégories de récepteurs;
- la recherche et l'identification des récepteurs " inhibiteurs " ainsi que celle des corps cellulaires des interneurones inhibiteurs (par microélectrode et oil-gap);
- l'identification de toutes les afférences et l'établissement de la cartographie des récepteurs cercaux en relation avec une fibre géante donnée;
- l'étude précise des courants ioniques synaptiques;
- des recherches complémentaires sur la transmission cholinergique mais surtout sur la transmission par le GABA ;
- l'analyse des réponses retardées avec peut-être la possibilité de contrôler des circuits complexes multineuroniques ou réverbérants;
- la nature et le rôle des pompes métaboliques au niveau synaptique, ainsi parallèlement que la recherche causale des hyperpolarisations post-tétaniques;
- l'étude d'éventuels potentiels miniatures.

La plupart des résultats que nous avons exposés ont pu être obtenus grâce à l'enregistrement externe sur une fibre géante isolée . Nous pensons que cette technique peut être appliquée aux autres fibres géantes (interneurones et même motoneurones) sur le même Insecte, d'autres Insectes, voire d'autres animaux. Il est cependant nécessaire de rester dans les limites de la constante d'espace et d'opérer sur des fibres nerveuses d'un certain diamètre. Signalons à ce sujet que le schéma fonctionnel que nous avons dressé plus haut, paraît également pouvoir s'appliquer aux autres fibres géantes du groupe ventral.

L'injection de jaune procion a montré (MILBURN et BENTLEY, 1971; HARRIS et SMYTH, 1971 b) que l'aspect anatomique des fibres I et III présente de grandes analogies avec celui de la fibre II. De nombreuses expériences électrophysiologiques nous ont également permis d'observer, bien que notre étude à ce sujet ne soit pas aussi complète que celle développée sur la fibre II, les mêmes principaux caractères:

- nombreuses afférences cercales excitatrices homo- et contralatérales;
- afférences inhibitrices également homo- et contralatérales;
- PPSEs et PPSIs unitaires tout à fait comparables.

Nous avons également effectué quelques essais pleinement réussis sur les fibres " géantes " du groupe dorsal, dont le diamètre (préparation en place) est compris entre 12 et 15 µm. Ces fibres sont d'ailleurs intégratrices et reçoivent aussi des afférences excitatrices et inhibitrices cercales. Les PPSEs et PPSIs unitaires ne semblent pas présenter de différences avec ceux que nous avons décrits. Le potentiel d'action propagé oscille entre 80 et 90 mV. Cette technique peut ainsi apporter, sur un nombre relativement restreint d'expériences, des renseignements précis sur la densité des afférences, leur qualité, leur provenance et cela à l'échelon unitaire.

Dans le cas de *Periplaneta americana*, on peut en outre envisager d'établir des comparaisons sur les deux sexes et peut-être même avec certains stades larvaires. Il serait ainsi possible de suivre l'évolution de la transmission synaptique et des relations " récepteur - centres nerveux ", au cours de l'ontogenèse.

Un développement particulier pourrait être accordé à des expériences pharmacologiques et il serait souhaitable de préciser le rôle éventuel de substances telles que la sérotonine, les catécholamines, la neurohormone D (1), des acides aminés autres que le GABA ou même des substances agonistes ou antagonistes du système cholinergique. Signalons à ce propos que notre

(1) Des expériences récentes (BIRKENBEIL, 1971) ont montré que cette substance est active au niveau du ganglion A_6 de *Periplaneta americana* (corps cellulaires et fibres intraganglionnaires). Cet auteur a même envisagé son rôle possible comme transmetteur.

préparation peut être également utilisée à l'étude d'agents insecticides sur le système nerveux central. Elle aurait l'avantage de pouvoir donner une idée plus précise sur leurs sites d'action.

En définitive, nous pouvons considérer notre premier but atteint dans la mesure où nous avons pu mettre en relief certains mécanismes fins de la transmission synaptique chez les Insectes et placé notre contribution sur un plan plus général, qui devrait permettre notamment de comparer, sur des bases plus précises, le fonctionnement du système nerveux central des Insectes à celui d'autres Invertébrés (Crustacés et Mollusques en particulier).

Enfin, il nous paraît possible de jeter un pont entre certains traits de comportement animal et les tenants et aboutissants qui lui sont associés notamment aux niveaux sensoriel et central. Nous voulons parler du rôle particulier de diverses catégories de récepteurs (récepteurs de position ou de mouvement), ainsi que d'une possible coordination avec des récepteurs " inhibiteurs " (mouvement des cerques). Il y a peut-être là une voie intéressante à prospecter qui permettrait de relier en une suite continue et complète tous les éléments impliqués dans un comportement donné.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Certains des résultats exposés dans le présent travail ont déjà fait l'objet de publications antérieures:

CALLEC, J.J. & BOISTEL, J. (1965 a) - Essai de localisation à l'aide de microélectrodes de zones synaptiques au niveau du 6ème ganglion abdominal d'un Insecte (cas particulier de *Periplaneta americana*). J. Physiol. Paris, 57, 233.

CALLEC, J.J. & BOISTEL, J. (1965 b) - Analysis with microelectrodes of the synaptic transmission at the level of the sixth abdominal ganglion of a cockroach, *Periplaneta americana* . In " The physiology of the Insect Central Nervous System", p. 59-65. Eds: J.E. Treherne & J.W.L. Beament. London & New-York. Academic Press.

CALLEC, J.J. & BOISTEL, J. (1966 a) - Etude de divers types d'activités électriques enregistrées par microélectrodes capillaires au niveau du dernier ganglion abdominal de la Blatte, *Periplaneta americana L.* C. R. Soc. Biol. 160, 1943-1947.

CALLEC, J.J. & BOISTEL, J. (1966 b) - Phénomènes d'excitation et d'inhibition au niveau du dernier ganglion abdominal de la Blatte, *Periplaneta americana L.* C.R. Soc.Biol. 160, 2418-2424.

CALLEC, J.J. & BOISTEL, J. (1967) - Les effets de l'acétylcholine aux niveaux synaptique et somatique dans le cas du dernier ganglion abdominal de la Blatte, *Periplaneta americana L.* C. R. Soc. Biol. 161, 442-446.

CALLEC, J.J. & BOISTEL, J. (1968) - Intracellular study of somatic and synaptic activities in the last abdominal ganglion of the Cockroach, *Periplaneta americana* . Proc. XXIV Int. Cong. IUPS, Washington, 7, 70.

CALLEC, J.J. & BOISTEL, J. (1971 a) - Phénomènes inhibiteurs chez un Insecte : étude à l'échelon unitaire au niveau d'une fibre nerveuse géante isolée de Blatte (6ème ganglion abdominal). J. Physiol. Paris, 63, 21-22.

CALLEC, J.J. & BOISTEL, J. (1971 b) - Rôle possible du GABA comme médiateur inhibiteur du système de fibres géantes chez la Blatte (*Periplaneta americana*). J. Physiol. Paris, 63, 119 A.

CALLEC, J.J. & BOISTEL, J. (1971 c) - Further evidence for ACh transmission in the Cockroach central nervous system studied at the unitary level. Proc. XXV Int. Cong. IUPS, Munich, 9, 95.

CALLEC, J.J., GUILLET, J.C., PICHON, Y. & BOISTEL, J. (1969) - Relations entre l'activité des mécanorécepteurs cercaux et les potentiels postsynaptiques correspondants recueillis au niveau d'une fibre géante isolée de Blatte (*Periplaneta americana*). J. Physiol. Paris, 61, 98.

CALLEC, J.J., GUILLET, J.C., PICHON, Y. & BOISTEL, J. (1971) - Further studies on synaptic transmission in Insects. II. Relations between sensory information and its synaptic integration at the level of a single giant axon in the Cockroach. J.Exp. Biol. 55, 123-149.

JEGO, P., CALLEC, J.J., PICHON, Y. & BOISTEL, J. (1970) - Etude électrophysiologique de corps cellulaires excitables du 6ème ganglion abdominal de *Periplaneta americana* . Aspects électriques et ioniques. C.R. Soc. Biol. 164, 893-900.

PICHON, Y. & CALLEC, J.J. (1970) - Further studies on synaptic transmission in Insects. I. External recording of synaptic potentials in a single giant axon of the Cockroach, *Periplaneta americana* . J. Exp. Biol. 52, 257-265.

ANDERSEN, P. & CURTIS, D.R. (1964 a) - The excitation of thalamic neurones by acetylcholine. Acta Physiol. Scand. 61, 85-99.

ANDERSEN, P. & CURTIS, D.R. (1964 b) - The pharmacology of the synaptic and acetylcholine-induced excitation of ventrobasal thalamic neurones. Acta Physiol. Scand. 61, 100-120.

ARAKI, T. & OTANI, T. (1955) - Response of single motoneurons to direct stimulation in Toad's spinal cord. J. Neurophysiol. 18, 472-485.

AUERBACH, A.A. & BENNETT, M.V.L. (1969) - Chemically mediated transmission at a giant fiber synapse in the Central Nervous System of a Vertebrate. J. Gen. Physiol. 53, 183-210.

AUERBACH, A.A. & BETZ, W. (1971) - Does curare affect transmitter release? J. Physiol. London, 213, 691-705.

AUGUSTINSSON, K.B. & GRAHN, M. (1954) - The occurrence of cholinesters in the Honeybee. Acta Physiol. Scand. 32, 174-190.

AUGUSTINSSON, K.B. & ISACHSEN, T. (1957) - The enzymic hydrolysis of the β - methyl derivatives of acetylcholine and acetylthiocholine. Acta Chem. Scand. 11, 750-751.

BAKER, P.F. (1965) - Phosphorus metabolism of intact Crab nerve and its relation to the active transport of ions. J. Physiol. London, 180, 383-423.

BAKER, R.W., CHOTHIA, C.H., PAULING, P. & PETCHER, T.J. (1971) - Structure and activity of muscarinic stimulants. Nature, London, 230, 439-445.

BARLOW, R.B. (1964) - In "Wenner-Gren Centre Intern. Symp. Tobacco Alkaloids and Related Compounds", 277. Pergamon Press, Oxford.

BARTON-BROWNE, L., DODSON, L.F., HODGSON, E.S. & KIRALY, J.K. (1961) - Adrenergic properties of the cockroach corpus cardiacum. Gen. Comp. Endocr. 1, 232-236.

BEANI, L., BIANCHI, C. & LEDDA, F. (1964) - The effect of tubocurarine on ACh release from motor nerve terminals. J. Physiol. London, 174, 172-183.

BEERS, W.H. & REICH, E. (1970) - Structure and activity of acetylcholine. Nature, London 228, 917-922.

BELLAMY, D. (1958) - The structure and metabolic properties of tissue preparations from *Schistocerca gregaria*. Biochem. J. 70, 580-589.

BENNETT, M.V.L. (1968) - Similarities between chemical and electrical mediated mediated transmission. In " Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration ".p. 73-128. Ed : F.D. Carlson. Englewood Cliffs-N.J. Prentice - Hall.

BENNETT, M.V.L., NAKAJIMA, Y. & PAPPAS, G.D. (1967) - Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. III. Giant electromotor neurons of *Malapterurus electricus*. J. Neurophysiol. 30, 209-235.

BENNETT, M.V.L. & PAPPAS, G.D. (1967) - Control of electric organ discharge in the Stargazer, *Astroscopus* ; an example of synchronized oculomotor activity. Abst. 11th Ann. Mtg. Biophys. Soc. 45.

BENTLEY, D.R. (1969 a) - Intracellular activity in Cricket neurons during the generation of behaviour patterns. J. Ins. Physiol. 15, 677-699.

BENTLEY, D.R. (1969 b) - Intracellular activity in Cricket neurons during generation of song patterns. Z. vergl. Physiol. 62, 267-283.

BERANEK, R. & MILLER, P.L. (1968) - Sensitivity of Insect muscles fibres to L-glutamate. J. Physiol. London, 196, 71 p - 72 p.

BERNARD, J., GAHERY, Y., & BOISTEL, J. (1965) - The effects of temperature changes applied to the cercal nerves and to the sixth abdominal ganglion of the Cockroach (*Periplaneta americana*). In " The Physiology of the Insect Central Nervous System " p. 67-72. Eds : J.E. Treherne & J.W.L. Beament, Academic Press. London & New-York.

BETZ, W.J. (1970) - Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the Frog. J. Physiol. London, 206, 629-644.

BIRKENBEIL, H. (1971) - Untersuchungen zur Wirkung von Neurohormon D und von anderen aktiven Substanzen auf das Zentralnervensystem der Schabe *Periplaneta americana* Zool. Jb. Abt. allg. Zool. Physiol. Tiere 75, 493-525.

BIRKS, R.I., BURSTYN, P.G.R. & FIRTH, D.R. (1968) - The form of sodium-calcium competition of the Frog myoneural junction. J. Gen. Physiol. 52, 887-907.

BIRKS, R.I. & COHEN, M.W. (1965) - Effects of sodium on transmitter release from Frog motor nerve terminals. In " Muscle ". p. 403-420. Eds : W.M. Paul, E.E. Daniel, C.M. Kay & G. Monckton. Pergamon Press, Oxford.

BIRKS, R.I. & COHEN, M.W. (1968) - The influence of internal sodium on the behaviour of motor nerve endings. Proc. Roy. Soc. B, 170, 401-421.

BJÖRKLUND, A., FALCK, B., & KLEMM, N. (1970) - Microspectrofluorimetric and chemical investigation of catecholamine-containing structures in the thoracic ganglia of Trichoptera (Insecta). J. Ins. Physiol. 16, 1147-1154.

BLACKMAN, J.G., GINSBORG, B.L. & RAY, J. (1963) - On the quantal release of the transmitter at a sympathetic synapse. J. Physiol. London, 167, 402-415.

BOECKH, J., SANDRI, C. & AKERT, K. (1970) - Sensorische Eingänge und Synaptische Verbindungen im Zentralnervensystem von Insekten. Z. Zellforsch. 103, 429-446.

BOISSEAU, J. & BOISTEL, J. (1965) - Contrôle au microscope électronique de microélectrodes de verre de différentes longueurs, vides ou remplies de solution conductrice. J. Physiol. Paris, 57, 529-535.

BOISTEL, J. (1959) - Quelques caractéristiques électriques de la membrane de la fibre nerveuse au repos d'un Insecte (*Periplaneta americana*). C.R. Soc. Biol. 153, 1009-1013.

BOISTEL, J. (1960) - Caractéristiques fonctionnelles des fibres nerveuses et des récepteurs tactiles et olfactifs des Insectes. Librairie Arnette, Paris, 147 p.

BOISTEL, J. (1968) - The synaptic transmission and related phenomena in Insects. In " Advances in Insect Physiology ." Vol.5, p.1-64. Eds : J.W.L. Beament, J.E. Treherne, V.B. Wigglesworth. Academic Press, London & New-York .

BOISTEL, J. & CORABOEUF, E. (1954 a) - Potentiels de membrane et potentiels d'action de nerf d'Insecte recueillis à l'aide de microélectrodes intracellulaires. C.R.Acad. Sci. Paris, 238, 2116-2118.

BOISTEL, J. & CORABOEUF, E. (1954 b) - Action de l'anhydride carbonique sur l'activité du nerf isolé d'Insecte. J. Physiol. Paris, 46, 258-261.

BOISTEL, J. & FATT, P. (1958) - Membrane permeability change during inhibitory transmitter action in Crustacean muscle. J. Physiol. London, 144, 176-191.

BOQUET, P., IZARD, Y., JOUANNET, M. & MEAUME, J. (1966) - Etude de deux antigènes toxiques du venin de *Naja nigricollis* . C.R. Acad. Sci. Paris, 262 , Sér. D., 1134-1137.

BOYD, I.A. & MARTIN, A.R. (1956) - The end-plate potential in Mammalian muscle. J. Physiol. London, 132, 74-91.

BRACHO, H. & ORKAND, R.K. (1970) - Effect of calcium on excitatory neuromuscular transmission in the Crayfish. J. Physiol. London, 206, 61-72.

BRADFORD, H.F., CHAIN, E.B., CORY, H.T. & ROSE, S.P.R. (1969) - Glucose and aminoacid metabolism in some invertebrate nervous systems. J. Neurochem. 16, 969-978.

BRADLEY, P.B. & CANDY, J.M. (1970) - Iontophoretic release of acetylcholine, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and D-lysergic acid diethylamide from micropipettes. Brit. J. Pharmacol. 40, 194-201.

BRUNER, J. & KEHOE, J.S. (1970) - Long-term decrements in the efficacy of synaptic transmission in Molluscs and Crustaceans. In " Long-term changes in Neural Activity and Behaviour " p. 323-359. Eds : G. Horn & R.A. Hinde. Cambridge University Press.

BRUNER, J. & KENNEDY, D. (1970) - Habituation at a Crayfish neuromuscular junction. Science, N.Y. 169, 92-94.

BRUNER, J. & TAUC, L. (1964) - Les modifications de l'activité synaptique au cours de l'habituation chez l'Aplysie. J.Physiol. Paris, 56, 360-361.

BRUNER, J. & TAUC, L. (1965) - La plasticité synaptique impliquée dans le processus d'habituation chez l'Aplysie. J. Physiol. Paris, 57, 230-231.

BRUNER, J. & TAUC, L. (1966 a) - Habituation at the synaptic level in Aplysia. Nature, London, 210, 37-39.

BRUNER, J. & TAUC, L. (1966 b) - Long-lasting phenomena in the Molluscan nervous system. In " Nervous and hormonal mechanisms of integration ". Symp. Soc. Exp. Biol. XX, p. 457-476. Cambridge University Press.

BUCHHOLTZ, C. (1964) - Elektronenmikroskopische befunde am bestrahlten Oberschlundganglion von Odonaten-larven (*Calopteryx splendens Haar.*). Z. Zellforsch. 63, 1-24.

BULTITUDE, K.H. (1958) - A technique for marking the site of recording with capillary microelectrodes. Quart. J. micr. Sci. 99, 61-63.

BURKE, R.E. (1967) - Composite nature of the monosynaptic excitatory postsynaptic potential. J. Neurophysiol. 30, 1114-1137.

CAJAL, S.R. & SANCHEZ, D. (1915) - Contribucion al conocimiento de los centros nerviosos de los Insectos. Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madr. 13, 1-164.

CARTA, S. FRONTALI, N. & VIVALDI, G. (1961) - Il contenuto in aminoacidi biberi e altri composti nel tessuto nervoso di *Apis mellifica L.* R.C. Ist. Sup. Sanit. 24, 407-422.

CASTELLUCCI, V., PINSKER, H., KUPFERMANN, I. & KANDEL, E.R. (1970) - Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in Aplysia. Science, N.Y. 167, 1745-1748.

CHADWICK, L.E. (1963) - Systematic pharmacology of the anticholinesterase (Anti-ChE) agents. Actions on Insects and others Invertebrates. In " Handbuch der experimentellen pharmäkologie". Cholinesterases and anticholinesterases agents. Vol. XV, p. 741-798. Ed : G.B. Koelle. Springer-Verlag. Berlin.

CHADWICK, L.E. (1964) - Inhibition of Fly-head cholinesterase in vitro by pilocarpine and atropine. J. Ins. Physiol. 10, 573-585.

CHADWICK, L.E. & HILL, D.L. (1947) - Inhibition of cholinesterase by di-isopropyl fluorophosphate, physostigmine and hexaethyltetraphosphate in the roach. J. Neurophysiol. 10, 235-246.

CHALAZONITIS, N. (1959) - Chémopotentiels des neurones géants fonctionnellement différenciés. Arch. Sci. Physiol. 13, 1-38.

CHALAZONITIS, N. (1963) - Effects of changes in pCO_2 and pO_2 on rythmic potentials from giant neurones. Ann. N.Y. Acad. Sci. 109, 451-479.

CHAMBERLAIN, W.F. & HOSKINS, W.M. (1951) - The inhibition of cholinesterase in the american Roach by organic insecticides and related phosphorus-containing compounds. J. econ. Ent. 44, 177-191.

CHANG, C.C. & LEE, C.Y. (1963) - Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinetus* and their modes of neuromuscular blocking action. Arch. Int. Pharmacodyn. 144, 241-257.

CHANG, S.C. & KEARNS, C.W. (1955) - The occurrence of acetylcholine in the nerve tissue of american Cockroaches. Program Third Ann. Meet.ent. Soc. Am. 30-31.

CHANGEUX, J.P., KASAI, M. & LEE, C.Y. (1970) - Use of a Snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1241-1247.

CHEFURKA, W. & SMALLMAN, B.N. (1956) - The occurrence of acetylcholine in the Housefly, *Musca domestica L.* Canad. J. Biochem. Physiol. 34, 731-742.

CHIARODO, A.J. (1968) - The fine structure of neurons and nerve fibres in the thoracic ganglion of the Blowfly, *Sarcophaga bullata* . J. Ins. Physiol. 14, 1169-1175.

CHIARODO, A.J. , KISSEL, J.H. & MACKELL, T.E. (1970) - Structure of synaptic relations in the larval central nervous systems of the Blowfly and Mealworm. J. Ins. Physiol. 16, 361-371.

CHOTHIA, C.H. (1970) - Interaction of acetylcholine with different cholinergic nerve receptors. Nature, London, 225, 36-38.

COLE, K.S. (1941) - Rectification and inductance in the Squid giant axon. J. Gen. Physiol. 25, 29-51.

COLHOUN, E.H. (1958 a) - Distribution of choline acetylase in Insect conductive tissue. Nature, London, 182, 1378.

COLHOUN, E.H. (1958 b) - Tetraethylpyrophosphate and acetylcholine in *Periplaneta ame ricana* . Science, N.Y. 127, 25.

COLHOUN, E.H. (1958 c) - Acetylcholine in *Periplaneta americana* . I. Acetylcholine levels in nervous tissue. J. Ins. Physiol. 2, 108-116.

COLHOUN, E.H. (1958 d) - Acetylcholine in *Periplaneta americana* . II. Acetylcholine and nervous activity. J. Ins. Physiol. 2, 117-127.

COLHOUN, E.H. (1959) - Physiological events in organophosphorus poisoning. Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 1127-1134.

COLHOUN, E.H. (1960) - Acetylcholine in *Periplaneta americana* . IV. Significance of esterase inhibition in intoxication, acetylcholine levels and nervous conduction. Canad. J. Biochem. Physiol. 38, 1363-1376.

COLHOUN, E.H. (1963 a) - Synthesis of 5-hydroxytryptamine in the american Cockroach. Experientia, 19, 9-10.

COLHOUN, E.H. (1963 b) - The physiological significance of acetylcholine in Insects and observations upon other pharmacologically active substances. In "Advances in Insect Physiology." Vol.1, p. 1-45. Eds: J.W.L. Beament, J.E. Treherne & V.B. Wigglesworth. Academic Press. London & New-York .

COLLEWIJN, H. & VAN HARREVELD, A. (1966) - Intracellular recording from cat spinal motoneurones during acute asphyxia . J. Physiol. London, 185, 1-14.

COLOMO, F. & RAHAMIMOFF, R. (1968) - Interaction between sodium and calcium ions in the process of transmitter release at the neuromuscular junction. J. Physiol. London, 198, 203-218.

CONNELLY, C.M. (1962) - Metabolic and electrochemical events associated with recovery from activity. Proc. XXII Int. Cong. Physiol. Lectures and Symposia. 1, 600-602.

COOMBS, J.S., CURTIS, D.R. & ECCLES, J.C. (1957 a) - The interpretation of spike potentials of motoneurones. J. Physiol. London, 139, 198-231.

COOMBS, J.S., CURTIS, D.R. & ECCLES, J.C. (1957 b) - The generation of impulses in motoneurones. J. Physiol. London, 139, 232-249.

CORTEGGIANI, E. & SERFATY, A. (1939) - Acetylcholine et cholinesterase chez les Insectes et les Arachnides. C. R. Soc. Biol. 131, 1124-1126.

CROSSMAN, A.R., KERKUT, G.A., PITMAN, R.M. & WALKER, R.J. (1971) - Electrically excitable nerve cell bodies in the central ganglia of two Insect species *Periplaneta americana* and *Schistocerca gregaria* . Investigation of cell geometry and morphology by intracellular dye injection. Comp. Biochem. Physiol. 40, 579-594.

CURTIS, D.R. (1961) - The identification of Mammalian inhibitory transmitters. In " Nervous inhibition " p. 342-349. Ed: E. Florey. Oxford: Pergamon Press.

CURTIS, D.R. (1970) - Central synaptic transmitters. Proc. Austr. Ass. Neurologists. 7, 55-59.

CURTIS, D.R. & CRAWFORD, J.M. (1969) - Central synaptic transmission. Microelectrophoretic studies. Ann. Rev. Pharmacol. 9, 204-240.

CURTIS, D.R., DUGGAN, A.W. & FELIX, D. (1970) - GABA and inhibition of Deiters' neurones. Brain Res. 23, 117-120.

CURTIS, D.R. & ECCLES, J.C. (1959) - The time courses of excitatory and inhibitory synaptic actions. J. Physiol. London, 145, 529-546.

CURTIS, D.R. & ECCLES, J.C. (1960) - Synaptic action during and after repetitive stimulation. J. Physiol. London, 150, 374-398.

CURTIS, D.R., HÖSLI, L., JOHNSTON, G.A.R. & JOHNSTON, I.H. (1968) - The hyperpolarization of spinal motoneurones by glycine and related amino-acids. Exp. Brain Res. 5, 235-258.

CURTIS, D.R., PHILLIS, J.W. & WATKINS, J.C. (1959) - The depression of spinal neurones by γ-aminobutyric acid and β-alanine. J. Physiol. London, 146, 185-203.

CURTIS, D.R. & RYALL, R.W. (1964) - Nicotinic and muscarinic receptors of Renshaw cells. Nature, London, 203, 652-653.

CURTIS, D.R. & WATKINS, J.C. (1965) - The pharmacology of amino acids related to γ-aminobutyric acid. Pharmacol. Rev. 17, 347-391.

DAGAN, D. & PARNAS, I. (1970) - Giant fibre and small fibre pathways involved in the evasive response of the Cockroach, *Periplaneta americana* . J. Exp. Biol. 52, 313-324.

D'AJELLO, V., MAGNI, F. & BETTINI, S. (1971) - The effect of the venom of the black widow Spider *Latrodectus mactans tredecimguttatus* on the giant neurones of *Periplaneta americana*. Toxicon, 9, 103-110.

DALE, H.H. (1914) - The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. J. Pharmacol. Exp. Therap. 6, 147-190.

DAUTERMAN, W.C., TALENS, A. & ASPEREN, K. VAN (1962) - Partial purification and properties of Flyhead cholinesterase. J. Ins. Physiol. 8, 1-14.

DAVIDOFF, R.A. & APRISON, M.H. (1969) - Picrotoxin antagonism of the inhibition of interneurones by glycine. Life Sci. 8 , 107-112.

DEL CASTILLO, J. & ENGBAEK, L. (1954) - The nature of neuromuscular block produced by magnesium. J. Physiol. London, 124, 370-384.

DEL CASTILLO, J. & KATZ, B. (1954 a) - The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. J. Physiol. London, 124, 553-559.

DEL CASTILLO, J. & KATZ, B. (1954 b) - Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. J. Physiol. London, 124, 574-585.

DEL CASTILLO, J. & STARK, L. (1952) - The effect of calcium ions on the motor end-plate potentials. J. Physiol. London, 116, 507-515.

DE ROBERTIS, E. (1971) - Molecular biology of synaptic receptors. Science, N.Y. 171, 963-971.

DODGE, F.A. & RAHAMIMOFF, R. (1967) - Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. J.Physiol. London, 193, 419-433.

DOUGLAS, W.W. (1968) - Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. First Gaddum Memorial Lecture, Cambridge, England. Brit. J. Pharmacol. 34, 451-474.

DUDEL, J. (1962) - Effect of inhibition on the presynaptic nerve terminal in the neuromuscular junction of the Crayfish. Nature, London, 193, 587-588.

DUDEL, J. (1965 a) - Potential changes in the Crayfish motor nerve terminal during repetitive stimulation. Pflügers Arch. ges. Physiol. 282, 323-337.

DUDEL, J. (1965 b) - Presynaptic and postsynaptic effects of inhibitory drugs on the Crayfish neuromuscular junction. Pflügers Arch. ges. Physiol. 283, 104-118.

DUDEL, J. & KUFFLER, S.W. (1961) - Mechanism of facilitation at the Crayfish neuromuscular junction. J. Physiol. London, 155, 530-542.

ECCLES, J.C. (1964) - " The physiology of synapses " Springer-Verlag, Berlin.

ECCLES, J.C., ECCLES, R.M. & MAGNI, F. (1961) - Central inhibitory action attributable to presynaptic depolarization produced by muscle afferent volleys. J. Physiol. London, 159, 147-166.

ECCLES, J.C., KATZ, B. & KUFFLER, S.W. (1941) - Nature of the " end-plate potential" in curarized muscle. J. Neurophysiol. 4, 362-387.

ECCLES, R.M., LOYNING, Y. & OSHIMA, T. (1966) - Effects of hypoxia on the monosynaptic reflex pathway in the Cat spinal cord. J. Neurophysiol. 29, 315-332.

EDWARDS, C. & KUFFLER, S.W. (1959) - The blocking effect of γ-aminobutyric acid (GABA) and the action of related compounds on single nerve cells. J. Neurochem. 4, 19-30.

ELLIOTT, K.A.C. & FLOREY, E. (1956) - Factor I. Inhibitory factor for brain. J. Neurochem. 1, 181-192.

ELMQVIST, D. & FELDMAN, D.S. (1965) - Calcium dependence of spontaneous acetylcholine release at Mammalian motor nerve terminals. J. Physiol. London, 181, 487-497.

ELMQVIST, D. & FELDMAN, D.S. (1966) - Influence of ionic environment on acetylcholine release from the motor nerve terminals. Acta Physiol. Scand. 67, 34-42.

ELMQVIST, D. & QUASTEL, D.M.J. (1965) - A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. J. Physiol. London, 178, 505-529.

ENGBERG, I. & THALLER, A. (1970) - On the interaction of picrotoxin with GABA and glycine in the spinal cord. Brain Res. 19, 151-154.

EPSTEIN, R. & TAUC, L. (1970) - Heterosynaptic facilitation and post-tetanic potentiation in Aplysia nervous system. J. Physiol. London, 209, 1-23.

FADIGA, E. & BROOKHART, J.M. (1962) - Interactions of excitatory post-synaptic potentials generated at different sites on the Frog motoneuron. J. Neurophysiol. 25, 790-804.

FALCK, B. & OWMAN, C. (1965) - A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of the biogenic amines. Acta Univ. Lund., Sect. II n°7, 1-23.

FARLEY, R.D. & MILBURN, N.S. (1969) - Structure and function of the giant fibre system in the Cockroach, *Periplaneta americana* . J. Ins. Physiol. 15, 457-476.

FATT, P. & KATZ, B. (1951) - An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. J. Physiol. London, 115, 320-369.

FATT, P. & KATZ, B. (1952) - Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. J. Physiol. London, 117, 109-128.

FATT, P. & KATZ, B. (1953) - The effect of inhibitory nerve impulses on a Crustacean muscle fibre. J. Physiol. London, 121, 374-389.

FELTZ, A. (1971) - Competitive interaction of β-guanidino propionic acid and γ-aminobutyric acid on the muscle fibre of the Crayfish. J. Physiol. London, 216, 391-401.

FESSARD, A. & TAUC, L. (1958) - Effets de répétition sur l'amplitude des potentiels postsynaptiques d'un soma neuronique. J. Physiol. Paris, 50, 277-281.

FLATTUM, R.F. & SHANKLAND D.L. (1971) - Acetylcholine receptors and the diphasic action of nicotine in the american Cockroach, *Periplaneta americana* . Comp. Gen. Pharmacol. 2, 159-167.

FLOREY, E. (1961) - Comparative physiology : transmitter substances. Ann. Rev. Physiol. 23, 501-528.

FLOREY, E. (1967) - Neurotransmitters and modulators in the animal kingdom. Fed. Proc. 26, 1164-1178.

FOX, P.M. & LARSEN, J.R. (1972) - Glutamic acid decarboxylase and the GABA shunt in the supraoesophageal ganglion of the Honey-bee, *Apis mellifera*. J. Ins. Physiol. 18, 439-458.

FRANK, K. & FUORTES, M.G.F. (1956) - Stimulation of spinal motoneurones with intracellular electrodes. J. Physiol. London, 134, 451-470.

FRANK, K. & FUORTES, M.G.F. (1957) - Presynaptic and postsynaptic inhibition of monosynaptic reflexes. Fed. Proc. 16, 39-40.

FRANKENHAEUSER, B. & HODGKIN, A.L. (1957) - The action of calcium on the electrical properties of squid axons. J. Physiol. London, 137, 218-244.

FRIEDMAN, K.J. & CARLSON, A.D. (1970) - The effets of curare in the Cockroach. II. Blockage of nerve impulses by d.TC. J. Exp. Biol. 52, 593-601.

FRONTALI, N. (1958) - Acetylcholine synthesis in the Housefly head. J. Ins. Physiol. 1, 319-326.

FRONTALI, N. (1961) - Activity of glutamic acid decarboxylase in Insect tissue. Nature, London, 191, 178-179.

FRONTALI, N. (1964) - Brain glutamic acid decarboxylase and synthesis of γ-aminobutyric acid in Vertebrate and Invertebrate species. In " Comparative Neurochemistry " p. 185-192. Ed. D. Richter, Pergamon Press, Oxford.

FRONTALI, N. (1968) - Histochemical localization of catecholamines in the brain of normal and drug-treated Cockroaches. J. Ins. Physiol. 14, 881-886.

FRONTALI, N. & HÄGGENDAL, J. (1969) - Noradrenaline and dopamine content in the brain of the Cockroach, *Periplaneta americana* . Brain Res. 14, 540-542.

FRONTALI, N. & MANCINI, G. (1970) - Studies on the neuronal organization of Cockroach corpora pedunculata. J.Ins. Physiol. 16, 2293-2301.

FRONTALI, N. & NORBERG, K.A. (1966) - Catecholamine containing neurons in the Cockroach brain. Acta Physiol. Scand. 66, 243-244.

FRONTALI, N., PIAZZA, R. & SCOPELLITI, R. (1971) - Localization of acetylcholine - esterase in the brain of *Periplaneta americana*. J. Ins. Physiol. 17, 1833-1842.

FURSHPAN, E.J. & POTTER, D.D. (1959) - Slow postsynaptic potentials recorded from the giant motor fiber of the Crayfish. J. Physiol. London, 145, 326-335.

GAGE, P.W. & HUBBARD, J.I. (1966) - An investigation of the post-tetanic potentiation of end-plate potentials at the Mammalian neuromuscular junction. J. Physiol. London, 184, 353-375.

GAGE, P.W. & QUASTEL, D.M.J. (1966) - Competition between sodium and calcium ions in transmitter release at Mammalian neuromuscular junctions. J. Physiol. London, 185, 95-123.

GAHERY, Y. & BOISTEL, J. (1965) - Study of some pharmacological substances which modify the electrical activity of the sixth abdominal ganglion of the Cockroach, *Periplaneta americana* . In " The Physiology of the Insect Central Nervous System " p.73-78. Eds; J.E. Treherne & J.W.L. Beament. Academic Press, London and New-York.

GAHERY, Y. & BOISTEL, J. (1966) - Contribution à l'étude électrophysiologique des voies afférentes et efférentes empruntant les nerfs cercaux chez la Blatte, *Periplaneta americana*. C.R. Soc. Biol. 159, 2487-2492.

GALINDO, A. (1969) - GABA - picrotoxin interaction in the Mammalian central nervous system. Brain Res. 14, 763-767.

GALINDO, A. (1971) - Prejunctional effect of curare : its relative importance. J. Neurophysiol. 34, 289-301.

GAUTRELET, J. (1938) - The existence of an acetylcholine complex in the brain and in various organs. Bull. de l'Acad. de Med. 120, 285-291.

GERSCH, M., FISCHER, F., UNGER, H. & KABITZA, W. (1961) - Vorkommen von Serotonin im Nervensystem von *Periplaneta americana* L. Z. Naturf. 16, 351-352.

GERSCHENFELD, H.M. (1966) - Chemical transmitters in Invertebrate nervous system. In " Nervous and Hormonal Mechanisms of Integration ". Symp. Soc. Exp. Biol. XX, 299-323. Cambridge University Press.

GERSCHENFELD, H.M., ASCHER, P. & TAUC, L. (1967) - Two different excitatory transmitters acting on a single Molluscan neurone. Nature, London, 213, 358-359.

GERSCHENFELD, H.M. & LASANSKY, A. (1964) - Action of glutamic acid and other naturally occurring amino-acids on Snail central neurons. Int. J. Neuropharmacol. 3, 301-314.

GERSCHENFELD, H.M. & STEFANI, E. (1965) - 5-hydroxytryptamine receptors and synaptic transmission in Molluscan neurone. Nature, London, 205, 1216-1218.

GERSCHENFELD, H.M. & STEFANI, E. (1966) - An electrophysiological study of 5-hydroxytryptamine receptors of neurones in the Molluscan nervous system. J. Physiol. London, 185, 684-700.

GERSCHENFELD, H.M. & TAUC, L. (1964) - Différents aspects de la pharmacologie des synapses dans le système nerveux central des Mollusques. J. Physiol. Paris, 56, 360-361.

GINSBORG, B.L. (1967) - Ion movements in junctional transmission. Pharmacol. Rev. 19, 289-316.

GORDON, H.T. & WELSH, J.H. (1948) - The role of ions in axon surface reactions to toxic organic components. J. Cell. Comp. Physiol. 31, 395-420.

GRUNDFEST, H., REUBEN, J.P. & RICKLES, W.H. (1959) - The electrophysiology and pharmacology of Lobster neuromuscular synapses. J. Gen. Physiol. 42, 1301-1323.

GUTHRIE, D.M. & TINDALL, A.R. (1968) - The biology of the Cockroach. Arnold Ed. London.

HAGIWARA, S. & WATANABE, A. (1956) - Discharges in motoneurones of Cicada. J. Cell. Comp. Physiol. 47, 415-428.

HARRIS, C.L. (1969) - Existence of a neural circuit for delayed excitation of giant axons in the american Cockroach. Thesis, Pennsylvania State University.

HARRIS C.L. & SMYTH, T.(1971 a) - Delayed firing of giant axons in the american Cockroach. J. Ins. Physiol. 17, 1565-1578.

HARRIS, C.L. & SMYTH, T. (1971 b) - Structural details of Cockroach giant axons revealed by injection dye. Comp. Biochem. Physiol. 40, 295-304.

HARVEY, A. M. & MAC INTOSH, F.C. (1940) - Calcium and synaptic transmission in a sympathetic ganglion. J.Physiol. London, 97, 408-416.

HEBB, C. (1970) - CNS at the cellular level : identity of transmitter agents. Ann. Rev. Physiol. 32, 165-192.

HEMSWORTH, B.A. & MITCHELL, J.F. (1969) - The characteristics of acetylcholine release mechanisms in the auditory cortex . Brit. J. Pharmacol. 36, 161-170.

HESS, A. (1958 a) - The fine structure of nerve cells and fibers, neuroglia and sheaths of the ganglion chain in the Cockroach (*Periplaneta americana*). J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 731-742.

HESS, A. (1958 b) - Experimental anatomical studies of pathways in the severed central nerve cord of the Cockroach. J. Morph. 103, 479-501.

HIDAKA, T., ITO, Y., KURIYAMA, H. & TASHIRO , N. (1969) - Neuromuscular transmission in the longitudinal layer of somatic muscle in the Earthworm: J. Exp. Biol. 50, 417-430.

HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F. & KATZ, B. (1949) - Ionic currents underlying activity in the giant axon of the Squid. Arch. Sci. Physiol. 3, 129-150.

HODGKIN, A.L. & KATZ, B. (1949) - The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the Squid. J. Physiol. London, 108, 37-77.

HODGSON, E.S. (1962) - Hormonal control of reproductive and adaptive behavior. Gen. Comp. Endocr. Suppl.1 , 180-187 .

HODGSON, E.S. & WRIGHT, A.M. (1963) - Action of epinephrine and related compounds upon the insect nervous system. Gen. Comp. Endocr. 3, 519-525.

HOLMES, O. (1962) - Effects of pH, changes in potassium concentration and metabolic inhibitors on the after-potentials of Mammalian non-medullated nerve fibres. Arch. Int. Physiol. 70, 211-245.

HOYLE, G. (1970) - Cellular mechanisms underlying behavior-neuroethology. In " Advances in Insect Physiology." Vol.7, p.349-444, Eds : J.W.L. Beament, J.E. Treherne and V.B. Wigglesworth. Academic Press, London & New-York.

HOYLE, G. & BURROWS, M. (1970) - Intracellular studies on identified neurons of Insects. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. exp. Biol. 29.

HUBBARD, J.I. (1959) - Post-activation changes at the Mammalian neuromuscular junction. Nature, London, 184, 1945-1947.

HUBBARD, J.I. (1961) - The effect of calcium and magnesium on the spontaneous release of transmitter from Mammalian motor nerve endings. J. Physiol. London, 158, 507-517.

HUBBARD J.I. (1963) - Repetitive stimulation at the Mammalian neuromuscular junction and the mobilization of transmitter. J. Physiol. London, 169, 641-662.

HUBBARD, J.I. (1970) - Mechanism of transmitter release. In " Progress in Biophysics and Molecular Biology." Vol.21, p.33-124. Eds : J.A.V. Butler & D. Noble. Pergamon Press: Oxford and New-York.

HUBBARD, J.I., JONES, S.F. & LANDAU, E.M. (1968) - On the mechanism by which calcium and magnesium affect the spontaneous release of transmitter from Mammalian motor nerve terminals. J. Physiol. London, 194, 355-380.

HUBBARD, J.I. & LOYNING, Y. (1966) - The effects of hypoxia on neuromuscular transmission in a Mammalian preparation. J. Physiol. London, 185, 205-223.

HUBBARD, J.I. & SCHMIDT, R.F. (1961) - Stimulation of motor nerve terminals . Nature, London, 191, 1103-1104.

HUBBARD, J.I. & SCHMIDT, R.F. (1963) - An electrophysiological investigation of Mammalian motor nerve terminals. J. Physiol. London, 166, 145-167.

HUBBARD, J.I. & WILSON, D.F. (1970) - Reduction of the quantum content of end-plate potential by atropine. Experientia, 26, 1234-1235.

HUBBARD, J.I., WILSON, D.F. & MIYAMOTO, M. (1969) - Reduction of transmitter release by d-tubocurarine. Nature, London, 223, 531-533.

HUBER, F. (1965) - Brain controlled behaviour in Orthopterans. In " The Physiology of the Insect Central Nervous System." p.233-246. Eds : J.E. Treherne & J.W.L. Beament. Academic Press, London and New-York.

HUDDART, H. (1971) - Ultrastructure of the prothoracic ganglion and connectives of the stick Insect in relation to function. J. Ins. Physiol. 17, 1451-1469.

HUGGINS, A.K., RICK, J.T. & KERKUT, G.A. (1967) - A comparative study of the intermediary metabolism of L-glutamate in muscle and nervous tissue. Comp. Biochem. Physiol. 21, 23-30.

HUGHES, G.M. (1965) - Neuronal pathways in the Insect central nervous system. In " The Physiology of the Insect Central Nervous System ". p.79-112. Eds : J.E. Treherne & J.W.L. Beament. Academic Press, London and New-York.

HUTTER, O.F. & KOSTIAL, K. (1954) - Effect of magnesium and calcium ions on the release of acetylcholine. J. Physiol. London, 124, 234-241.

ITO, Y., KURIYAMA, H. & TASHIRO, N. (1969) - Effects of γ-aminobutyric acid and picrotoxin on the permeability of the longitudinal muscle of the Earthworm to various anions. J. Exp. Biol. 51, 363-375.

IWASAKI, S. & WILSON, D.M. (1966) - Neuropile potentials following wing sensory nerve stimulation in Locusts. Comp. Biochem. Physiol. 17, 693-695.

IYATOMI, K. & KANESHINA, K. (1958) - Localization of cholinesterase in the american Cockroach. Jap. J. appl. Ent. Zool. 2, 1-10.

JEGO, P. & BOISTEL, J. (1970) - Mécanisme d'action possible de la sérotonine sur la membrane nerveuse de corps cellulaires d'Insecte : cas particulier de la Blatte, *Periplaneta americana L.* C.R. Soc. Biol. 164, 2125-2133.

JEGO, P., JOUAN, P. & BOISTEL, J. (1970) - Action de la sérotonine base sur l'activité efférente du 6ème ganglion abdominal de la Blatte *Periplaneta americana* C. R. Soc. Biol. 164, 1650-1660.

JENKINSON, D.H. (1957) - The nature of the antagonism between calcium and magnesium ions at the neuromuscular junction. J. Physiol. London, 138, 434-444.

JENKINSON, D.H. (1960) - The antagonism between tubocurarine and substances which depolarize the motor end-plate. J. Physiol. London, 152, 309-324.

KANDEL, E.R. & TAUC, L. (1964) - Mechanism of prolonged heterosynaptic facilitation in a giant ganglion cell of *Aplysia depilans* . Nature, London, 202, 145-147.

KANDEL, E.R. & TAUC, L. (1965 a) - Heterosynaptic facilitation in neurones of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans* . J. Physiol. London, 181, 1-27.

KANDEL, E.R. & TAUC, L. (1965 b) - Mechanism of heterosynaptic facilitation in the giant cell of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans* . J. Physiol. London, 181, 28-47.

KATZ, B. (1966) - Nerve, Muscle and Synapse. Mc Graw-hill, New-York, London.

KATZ, B. (1969) - The release of neural transmitter substances. The Sherrington Lectures X. Liverpool University Press.

KATZ, B. & MILEDI, R. (1963) - A study of spontaneous miniature potentials in spinal motoneurones. J. Physiol. London, 168, 389-422.

KATZ, B. & MILEDI, R. (1965) - The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. Proc. Roy. Soc. B, 161, 496-503.

KATZ, B. & MILEDI, R. (1967 a) - The timing of calcium action during neuromuscular transmission. J. Physiol. London 189, 535-544.

KATZ, B. & MILEDI, R. (1967 b) - The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses. Proc. Roy. Soc. B, 167, 23-38

KATZ, B. & MILEDI, R. (1968) - The role of calcium in neuromuscular facilitation. J. Physiol. London, 195, 481-492.

KATZ, B. & MILEDI, R. (1969) - The effect of divalent cations on transmission in the Squid giant synapse. Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 37, 303-310.

KATZ, B. & THESLEFF, S. (1957) - A study of the " desensitization " produced by acetylcholine at the motor end-plate. J. Physiol. London, 138, 63-80.

KAWAMURA, H. & PROVINI, L. (1970) - Depression of cerebellar Purkinje cells by microiontophoretic application of GABA and related amino-acids. Brain Res. 24, 293-304.

KEHOE JacSUE & ASCHER, P. (1970) - Re-evaluation of the synaptic activation of an electrogenic sodium pump. Nature, London, 225, 820-823.

KELLY, J.S. (1965) - Antagonism between Na^{+} and Ca^{++} at the neuromuscular junction. Nature, London, 205, 296-297.

KENDIG, J.J. (1968) - Motor neurone coupling in Locust flight. J. Exp. Biol. 48, 389-404.

KERKUT, G.A., LEAKE, L.D., SHAPIRA, A. COWAN, S. & WALKER, R.J. (1965) - The presence of glutamate in nerve-muscle perfusates of *Helix*, *Carcinus* and *Periplaneta* . Comp. Biochem. Physiol. 15, 485-502.

KERKUT, G.A., OLIVER, G.W.O., RICK, J.T. & WALKER, R.J. (1970) - The effects of drug on learning in a simple preparation. Comp. Gen. Pharmacol. 1, 437-483.

KERKUT, G.A., PITMAN, R.M. & WALKER, R.J. (1968) - Electrical activity in Insect nerve cell bodies. Life Sci. 7, 605-607.

KERKUT, G.A., PITMAN, R.M. & WALKER, R.J. (1969 a) - Sensitivity of neurones of the Insect central nervous system to iontophoretically applied acetylcholine or GABA. Nature, London, 222, 1075-1076.

KERKUT, G.A., PITMAN, R.M. & WALKER, R.J. (1969 b) - Iontophoretic application of acetylcholine and GABA onto Insect central neurones. Comp. Biochem. Physiol. 31, 611-633.

KERKUT, G.A., SHAPIRA, A. & WALKER, R.J. (1965) - The effect of acetylcholine, glutamic acid and GABA on the contractions of the perfused Cockroach leg. Comp. Biochem. Physiol. 16, 37-48.

KERKUT, G.A. & WALKER, R.J. (1961) - The effects of drugs on the neurones of the Snail *Helix aspersa* . Comp. Biochem. Physiol. 3, 143-160.

KLEMM, N. (1968) - Monoaminhaltige Strukturen im Zentralnervensystem der Trichoptera (Insecta). I. Z. Zellforsch. 92, 487-502.

KLEMM, N. & BJÖRKLUND, A. (1971) - Identification of dopamine and noradrenaline in nervous structures of the Insect brain. Brain Res. 26, 459-464.

KOELLE, G.B. (1954) - The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the Rat. J. Comp. Neurol. 100, 211-223.

KOELLE, G.B. (1963) - Cytological distributions and physiological functions of cholinesterases. In " Handbuch der Experimentellen Pharmakologie ". p. 187-298. Ed. G.B. Koelle. Springer-Verlag. Berlin.

KOKETSU, K. (1969) - Calcium and the excitable cell membrane. In " Neurosciences Research " Vol.2, p. 1-39. Eds. S. Ehrenpreis & O.C. Solnitzky. Academic Press.

KOLMODIN, G.M. & SKOGLUND, C.R. (1959) - Influence of asphyxia on membrane potential level and action potentials of spinal moto-and interneurons. Acta Physiol. Scand. 45, 1-18.

KOSTERLITZ, H.W., LEES, G.M. & WALLIS, D.I. (1968) - Resting and action potentials recorded by the sucrose-gap method in the superior cervical ganglion of the Rabbit. J. Physiol. London, 195, 39-53.

KOSTERLITZ, H.W., LEES, G.M. & WALLIS, D.I. (1970) - Synaptic potentials recorded by the sucrose-gap method from the Rabbit superior cervical ganglion. Brit. J. Pharmacol. 40, 275-293.

KOSTERLITZ, H.W. & WALLIS, D.I. (1966) - The use of the sucrose-gap method for recording ganglionic potentials. J. Physiol. London, 183, 1-3P.

KRNJEVIC, K. & SCHWARTZ, S. (1966 a) - Cortical inhibition and GABA. Fed. Proc. 25, 627.

KRNJEVIC, K. & SCHWARTZ, S. (1966 b) - Is γ-aminobutyric acid an inhibitory transmitter ? Nature, London, 211, 1372-1374.

KRNJEVIC, K. & SCHWARTZ, S. (1967) - The action of γ-aminobutyric acid on cortical neurones. Exp. Brain Res. 3, 320-336.

KUBA, K. & TOMITA, T. (1971) - Effect of prostigmine on the time course of the end-plate potential in the Rat diaphragm. J. Physiol. London, 213, 533-544.

KUFFLER, S.W. (1960) - Excitation and inhibition in single nerve cells. Harvey Lect. 54, 176-218.

KUNO, M. (1964 a) - Quantal components of excitatory synaptic potentials in spinal motoneurones. J. Physiol. London, 175, 81-99.

KUNO, M. (1964 b) - Mechanism of facilitation and depression of the excitatory synaptic potential in spinal motoneurones. J. Physiol. London, 175, 100-112.

KUSANO, K. (1970) - Influence of ionic environment on the relationship between pre- and postsynaptic potentials. J. Neurobiol. 1, 435-457.

KUSANO, K. & HAGIWARA, S. (1961) - On the integrative synaptic potentials of *Onchidium* nerve cell. Jap. J. Physiol. 11, 96-101.

LAMPARTER, H.E., STEIGER, U., SANDRI, C. & AKERT, K. (1969) - Zum Feinbau der Synapsen im Zentralnervensystem der Insekten. Z. Zellforsch. 99, 435-442.

LANDAU, E.M. (1968) - A threshold for the effect of depolarization on transmitter release from Mammalian motor nerve terminals. Aust. J.Exp. Biol. 66, 2P.

LANDOLT, A.M. & RIS, H. (1966) - Electron microscope studies on soma-somatic interneuronal junctions in the corpus pedunculatum of the Wood ant (*Formica lugubris Zett.*). J. Cell. Biol. 28, 391-403.

LANDOLT, A.M. & SANDRI, C. (1966) - Cholinergische Synapsen im Oberschlunganglion der Waldameise (*Formica lugubris Zett.*). Z. Zellforsch. 69, 246-259.

LANE, N.J. & TREHERNE, J.E. (1970) - Lanthanum staining of neurotubules in axons from Cockroach ganglia. J. Cell. Biol. 7, 217-231.

LARSEN, J.R., MILLER, D.M. & YAMAMOTO, T. (1966) - d-tubocurarine chloride: effect on Insects. Science, N.Y. 152, 225-226.

LEE, C.Y. & CHANG, C.C. (1966) - Mode of actions of purified toxins from elapid venom on neuromuscular transmission. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac. 33, 555.

LEE, C.Y., TSENG, L.F. & CHIU, T.H. (1967) - Influence of denervation on localization of neurotoxins from elapid venoms in Rat diaphragm. Nature, London, 215, 1177-1178.

LEGHISSA, S. (1942) - Peculiari connessioni nervose nella catena ganglionare di *Carausius morosus* . Arch. Zool. Ital. 30, 289-310.

LEWIS, S.E. (1953) - Acetylcholine in Blowflies. Nature, London, 172, 1004-1005.

LEWIS, S.E. & SMALLMAN, B.N. (1956) - The estimation of acetylcholine in Insects. J. Physiol. London, 134, 241-256.

LILEY, A.W. (1956) - The quantal components of the Mammalian end-plate potential. J. Physiol. London, 133, 571-587.

LILEY, A.W. & NORTH, K.A.K. (1953) - An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on Mammalian neuromuscular junction. J. Neurophysiol. 16, 509-527.

LUNDBERG, A. & QUILISCH, H. (1953 a) - Presynaptic potentiation and depression of neuromuscular transmission in Frog and Rat. Acta Physiol. Scand. 30, suppl. 111, 111-120.

LUNDBERG, A. & QUILISCH, H. (1953 b) - On the effect of calcium on presynaptic potentiation and depression at the neuromuscular junction. Acta Physiol. Scand. 30, suppl. 111, 121-129.

Mc LENNAN, H. (1963) - Synaptic transmission. Philadelphie: Saunders.

MAENO, T. & EDWARDS, C. (1969) - Neuromuscular facilitation with low-frequency stimulation and effects of some drugs. J. Neurophysiol. 32, 785-792.

MALLART, A. & MARTIN, A.R. (1967) - An analysis of facilitation of transmitter release at the neuromuscular junction of the Frog. J. Physiol. London, 193, 679-694.

MAMBRINI, J. & BENOIT, P.R. (1964) - Action du calcium sur la jonction neuro-musculaire chez la Grenouille. C. R. Soc. Biol. 158, 1454-1458.

MANCINI, G. & FRONTALI, N. (1967) - Fine structure of the mushroom body neuropile of the brain of the Roach, *Periplaneta americana* . Z. Zellforsch. 83, 334-343.

MANCINI, G. & FRONTALI, N. (1970) - On the ultrastructural localization of catecholamines in the beta lobes (corpora pedunculata) of *Periplaneta americana*. Z. Zellforsch. 103, 341-350.

MANDELSTAM, J.E. (1963) - En russe. Mécanismes physiologiques de l'action des composés phosphorganiques chez les Insectes. Revue entomol. 42, 329-336.

MANDELSTAM, J.E. (1969) - En russe. Particularités fonctionnelles et structurales de la transmission synaptique chez les Insectes. Tr. Vses. Entomol. Obshchestva. 53, 60-93.

MARTIN, A.R. & PILAR, G. (1964) - Quantal components of the synaptic potential in the ciliary ganglion of the Chick. J. Physiol. London, 175, 1-16.

MASLAND, R.L. & WIGTON, R.S. (1940) -Nerve activity accompanying fasciculation produced by prostigmine. J. Neurophysiol. 3, 269-275.

MAYNARD, D.M. (1956) - Electrical activity in the Cockroach cerebrum. Nature, London, 177, 529-530.

MEHROTRA, K.N. (1961) - Properties of choline acetylase from the Housefly, *Musca domestica*. J. Ins. Physiol. 6, 215-221.

METCALF, R.L. & MARCH, R.B. (1949) - Mode of action of parathion and its derivatives and their toxicity to Insects. J. econ. Ent. 42, 721-728.

METCALF, R.L. , MAXON, M., FUKUTO, T.R. & MARCH, R.B. (1956) - Aromatic esterase in Insects. Ann. entom. Soc. Amer. 49, 274-279.

MEUNIER, J.C., OLSEN, R., MENEZ, A., MORGAT, J.L., FROMAGEOT, P., RONSERAY, A.M., BOQUET, P. & CHANGEUX, J.P. (1971) - Quelques propriétés physiques de la protéine réceptrice de l'acétylcholine étudiées à l'aide d'une neurotoxine radioactive. C.R. Acad. Sci. Paris, 273, Sér. D. 595-598.

MIKALONIS, S.J. & BROWN, R.H. (1941) - Acetylcholine and cholinesterase in the Insect central nervous system. J. Cell. Comp. Physiol. 18, 401-403.

MILBURN, N.S. (1968) - Fine structure of the cercal nerve-giant fiber synapse in the sixth abdominal ganglion of *Periplaneta americana* . Am. Zool. 8, 778.

MILBURN, N.S. & BENTLEY, D.R. (1971) - On the dendritic topology and activation of Cockroach giant interneurones. J. Ins. Physiol. 17, 607-623.

MILBURN, N.S. & ROEDER, K.D. (1960) - Chemical control of efferent activity from the sixth abdominal ganglion of the Cockroach. Proc. XIth Int. Cong. Ent. Vienne, 636-638.

MILBURN, N.S. & ROEDER, K.D. (1962) - Control of efferent activity in the Cockroach terminal abdominal ganglion by extract of *Corpora cardiaca* . Gen. Comp. Endocr. 2, 70-76.

MILBURN, N.S., WEIANT, E.A. & ROEDER, K.D. (1960) - The release of efferent nerve activity in the Roach, *Periplaneta americana* , by extracts of the *Corpus cardiacum* . Biol. Bull. 118, 111-119.

MILEDI, R. (1966) - Strontium as a substitute for calcium in the process of transmitter release at the neuromuscular junction. Nature, London, 212, 1233-1234.

MILEDI, R. (1971) - Lanthanum ions abolish the " calcium response " of nerve terminals. Nature, London, 229, 410-411.

MILEDI, R., MOLINOFF, P. & POTTER, L.T. (1971) - Isolation of the cholinergic receptor protein of *Torpedo* electric tissue. Nature, London, 229, 554-557.

MILEDI, R. & SLATER, C.R. (1966) - The action of calcium on neuronal synapses in the Squid. J. Physiol. London, 184, 473-498.

MOLLOY, F.M. (1961) - The histochemistry of the cholinesterase in the central nervous system of susceptible and resistant strains of the Housefly, *Musca domestica L.* , in relation to diazinon poisoning. Bull. ent. Res. 52, 667-681.

MOOREFIELD, H.H. & LANHAM, W.M. (1959) - A new class of cyclic phosphate insecticides. First Joint Meeting entom. Soc. Ont., entom. Soc. Canad., entom. Soc. Amer. Detroit, Michigan.

MORRIS, M.E. (1971) - The action of carbon dioxide on synaptic transmission in the cuneate nucleus. J. Physiol. London, 218, 671-690 .

MULLONEY, B. (1970) - Structure of the giant fibers of Earthworms. Science, N.Y. 168, 994-995.

NARAHASHI, T. (1961) - Effect of barium ions on membrane potentials of Cockroach giant axons. J. Physiol. London, 156, 389-414.

NARAHASHI, T. (1963) - The properties of Insect axons. In " Advances in Insect Physiology ,"Vol.1, p.175-256. Eds : J.W.L. Beament, J.E. Treherne & V.B. Wigglesworth. Academic Press, London & New-York.

NELSON, P.G. & FRANK, K. (1963) - Intracellularly recorded responses of nerve cells to oxygen deprivation. Am. J. Physiol. 205, 208-212.

NICKLAUSS, R. (1965) - Die Erregung einzelner Fadenhaare von *Periplaneta americana* in Abhängigkeit von der Grösse und Richtung der Auslenkung. Z. vergl. Physiol. 50, 331-362.

OBATA, K., ITO, M., OCHI, R. & SATO, N. (1967) - Pharmacological properties of the postsynaptic inhibition by Purkinje cell axons and the action of γ-amino-butyric acid on Deiters' neurones. Exp. Brain Res. 4, 43-57.

O'BRIEN, R.D. (1953) - Occurrence of cholinesterase in *Tenebrio* and *Tribolium*. Nature, London, 172, 162.

O'BRIEN, R.D. (1957) - Esterases in the semi-intact Cockroach. Ann. entom. Soc. Amer. 50, 223-229.

O'BRIEN, R.D. & FISHER, R.W. (1956) - The relation between ionization and toxicity to Insects for some neuropharmacological compounds. J. econ. Ent. 51, 169-175.

OCHI, R. (1969) - Ionic mechanism of the inhibitory postsynaptic potential of Crayfish giant motor fiber. Pflügers Arch. ges. Physiol. 311, 131-143.

OLIVER, G.W.O., TABERNER, P.V., RICK, J.T. & KERKUT, G.A. (1971) - Changes in GABA level, GAD and ChE activity in CNS of an Insect during learning. Comp. Biochem. Physiol. 38 B, 529-535.

OSBORNE, M.P. (1966) - The fine structure of synapses and tight junctions in the central nervous system of the Blowfly larva. J. Ins. Physiol. 12, 1503-1512.

ÖSTLUND, E. (1954) - The distribution of catecholamines in lower animals an their effect on the heart. Acta Physiol. Scand. 31, suppl.112, 1-67.

OTSUKA M., ENDO, M. & NONOMURA Y. (1962) - Presynaptic nature of neuro-muscular depression. Jap. J. Physiol. 12, 573-584.

OTSUKA, M., IVERSEN, L.L., HALL, Z.W. & KRAVITZ, E.A. (1966) - Release of γ-aminobutyric acid from inhibitory nerves of Lobster. Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 1110-1115.

OZBAS, S. & HODGSON, E.S. (1958) - Action of Insect neurosecretion upon central nervous system in vitro and upon behavior. Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 825-830.

PALAY, S.L. (1958) - The morphology of synapses in the central nervous system. Exp. Cell. Res. suppl.5, 275-293.

PARNAS, I., SPIRA, M.E., WERMAN, R. & BERGMANN, F. (1969) - Non-homogeneous conduction in giant axons of the nerve cord of *Periplaneta americana* . J. Exp. Biol. 50, 635-649.

PAULING, P.J. & PETCHER , T.J. (1970) - Interaction of atropine with the muscarinic receptor. Nature, London, 228, 673-674.

PEARSON, K.G. & BERGMAN S.J. (1969) - Common inhibitory motoneurones in Insects. J. Exp. Biol. 50, 445-471.

PICHON, Y. (1969) - Aspects électriques et ioniques du fonctionnement nerveux chez les Insectes. Cas particulier de la chaîne nerveuse abdominale d'une Blatte, *Periplaneta americana L.* Thèse d'Etat, Paris, 247 p.

PICHON, Y. & BOISTEL, J. (1966) - Etude de la fibre isolée d'Insecte. Enregistrement des potentiels de membrane et des potentiels d'action de la fibre géante de Blatte, *Periplaneta americana L.* C. R. Soc. Biol. 160, 1948-1954.

PICHON, Y. & BOISTEL, J. (1967) - Current-voltage relations in the isolated giant axon of the Cockroach under voltage-clamp conditions. J. Exp. Biol. 47, 343-355.

PICHON, Y. & TREHERNE, J.E. (1972) - The Insect blood brain barrier (in preparation). In " Advances in Insect Physiology ". Eds : J.W.L. Beament, J.E. Treherne & V.B. Wigglesworth. Academic Press, London & New-York.

PINSKER, H. & KANDEL, E.R. (1969) - Synaptic activation of an electrogenic sodium pump. Science, N.Y. 163, 931-935.

PIPA, R.L., COOK, E.F. & RICHARDS, A.G. (1959) - Studies on the hexapod nervous system. II. The histology of the thoracic ganglia of the adult Cockroach, *Periplaneta americana L.* J. Comp. Neurol. 113, 401-433.

PITMAN, R.M. (1971) - Transmitter substances in Insects : a review. Comp. Gen. Pharmacol. 2, 347-371.

PITMAN, R.M. & KERKUT, G.A. (1970) - Comparison of the actions of iontophoretically applied acetylcholine and GABA with the EPSP and IPSP in Cockroach central neurons. Comp. Gen. Pharmacol. 1, 221-230.

PORTER, R. (1970) - Early facilitation at corticomotoneuronal synapses. J. Physiol. London, 207, 733-745.

PRESTON, J.B. & KENNEDY, D. (1960) - Integrative synaptic mechanisms in the caudal ganglion of the Crayfish. J. Gen. Physiol. 43, 671-681.

PRESTON, J.B. & KENNEDY, D. (1962) - Spontaneous activity in Crustacean neurons. J. Gen. Physiol. 45, 821-836.

PUMPHREY, R.J. & RAWDON-SMITH, A.F. (1937) - Synaptic transmission of nervous impulses through the last abdominal ganglion of the Cockroach. Proc. Roy. Soc. B , 122, 106-118.

QUASTEL, D.M.J., HACKETT, J.T. & COOKE, J.D. (1971) - Calcium : is it required for transmitter secretion ? Science, N.Y. 172, 1034-1036.

RAHAMIMOFF, R. (1968) - A dual effect of calcium ions on neuromuscular facilitation. J. Physiol. London, 195, 471-480.

RAMADE, F. & L'HERMITE, P. (1971) - Mise en évidence de neurones adrénergiques par la microscopie de fluorescence dans le système nerveux central de *Calliphora erythrocephala Meig.* et de *Musca domestica L.* C. R. Acad. Sci. Paris, 272, Sér.D. , 3314-3317.

RANDIC, M. & PADJEN, A. (1967) - Effect of calcium ions on the release of acetylcholine from the cerebral cortex. Nature, London, 215, 990.

RANG, H.P. & RITCHIE, J.M. (1968) - On the electrogenic sodium pump in Mammalian non-myelinated nerve fibres and its activation by various external cations. J. Physiol. London, 196, 183-222.

RAY, J.W. (1964) - The free amino acid pool of the Cockroach (*Periplaneta americana*) central nervous system and the effect of insecticides. J. Ins. Physiol. 10, 587-597.

RAY, J.W. (1965) - The free amino acid pool of Cockroach (*Periplaneta americana*) central nervous system. In " The Physiology of the Insect Central Nervous System "p. 31-38. Eds : J.E. Treherne & J.W.L. Beament. Academic Press. London & New-York.

RIKER, W.F. (1966) - Actions of acetylcholine on Mammalian motor nerve terminal. J. Pharmacol. Exp. Therap. 152, 397-416.

RIKER, W.F. & OKAMOTO, M. (1969) - Pharmacology of motor nerve terminals. Ann. Rev. Pharmacol. 9, 173-208.

RITCHIE, J.M. (1967) - The oxygen consumption of Mammalian non-myelinated nerve fibres at rest and during activity. J. Physiol. London, 188, 309-329.

RITCHIE, J.M. & STRAUB, R.W. (1957) - The hyperpolarization which follows activity in Mammalian non-medullated fibres. J. Physiol. London, 136, 80-97.

ROBBINS, J. (1959) - The excitation and inhibition of Crustacean muscle by amino acids. J. Physiol. London, 148, 39-50.

ROBBINS, J. & VAN DER KLOOT, W.G. (1958) - The effect of picrotoxin on peripheral inhibition in the Crayfish. J. Physiol. London, 143, 541-552.

ROEDER, K.D. (1948 a) - Organization of the ascending giant fiber system in the Cockroach (*Periplaneta americana*). J. Exp. Zool. 108, 243-261.

ROEDER, K.D. (1948 b) - The effect of anticholinesterase and related substances on nervous activity in the Cockroach. Johns Hopk. Hosp. Bull. 83, 587-600.

ROEDER, K.D. (1948 c) - The effects of potassium and calcium on the nervous system of the Cockroach, *Periplaneta americana*. J. Cell. Comp. Physiol. 31, 327-338.

ROEDER, K.D., KENNEDY, N.K. & SAMSON, E.A. (1947) - Synaptic conduction to giant fibers of the Cockroach and the action of anticholinesterases. J. Neurophysiol. 10, 1-10.

ROEDER, K.D. & ROEDER, S. (1939) - Electrical activity in the isolated nerve cord of the Cockroach. I. The action of pilocarpine, nicotine, eserine and acetylcholine. J. Cell. Comp. Physiol. 14, 1-12.

ROEDER, K.D., TOZIAN, L. & WEIANT, E.A. (1960) - Endogenous nerve activity and behavior in the Mantis and Cockroach. J. Ins. Physiol. 4, 45-62.

ROSENTHAL, J. (1969) - Post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the Frog. J. Physiol. London, 203, 121-133.

ROWE, E.C. (1960) - Activity of single nerve cells in an Insect thoracic ganglion. Anat. Rec. 137, 389.

ROWE, E.C. (1963) - Microelectrode records from an Insect thoracic ganglion. Thèse Ph.D, University of Michigan.

ROWE, E.C. (1969) - Microelectrode records from a Cockroach thoracic ganglion: synaptic potentials and temporal patterns of spike activity. Comp. Biochem. Physiol. 30, 529-539.

ROWELL, C.H.F. (1970) - Incremental and decremental processes in the Insect central nervous system. In " Short-term changes in Neural Activity and Behaviour". p. 237-280. Eds : G. Horn & R.A. Hinde. Cambridge University Press.

RUBIN, R.P. (1970) - The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. Pharmacol. Rev. 22, 389-428.

SCHÜRMANN, F.W. (1970) - Uber die Struktur der Pilzkörper des Insektenhirns. I. Synapsen im Pedunculus. Z. Zellforsch. 103, 365-381.

SCHÜRMANN, F.W. (1971) - Synaptic contacts of association fibres in the brain of the Bee. Brain Res. 26, 169-176.

SHANES, A.M. (1958) - Electrochemical aspects in excitable cells. Pharmacol. Rev. 10, 59-273.

SHANKLAND, D.L., ROSE, J.A. & DONNIGER, C. (1971) - The cholinergic nature of the cercal nerve - giant fiber synapse in the sixth abdominal ganglion of the american Cockroach, *Periplaneta americana L.* J. Neurobiol. 2, 247-262.

SHEFTER, E. & TRIGGLE, D.J. (1970) - Is there a unique conformation of cholinergic ligands responsible for muscarinic activity ? Nature, London, 227, 1354-1355.

SHERMAN, R.G. & ATWOOD, H.L. (1971) - Synaptic facilitation : long-term neuromuscular facilitation in Crustaceans. Science, N.Y. 171, 1248-1250.

SHERRINGTON, C.S. (1897) - The central nervous system. Vol.3. In " A Text-book of Physiology ". 7th ed. Ed. M. Foster. London: Macmillan.

SITTLER, O.D. & DE REMER, R.J.(1967) - γ-aminobutyric acid induced changes in the spontaneous firing rates of Insect neurons. Experientia, 23, 284-288.

SMALLMAN, B.N. (1956) - Mechanism of acetylcholine synthesis in the Blowfly. J. Physiol. London, 132, 343-357.

SMALLMAN, B.N. (1958) - The physiological basis for the mode of action of organophosphorus Insecticides. Proc. Xth Int. Cong. Ent. 2, 5-12.

SMALLMAN, B.N. (1961) - Determination of choline acetylase activity. Meth. in med. Res. Chicago, 9, 203-207.

SMALLMAM, B.N. & FISHER, R.W. (1958) - Effect of anticholinesterases on acetylcholine levels in Insects. Canad. J. Biochem. 36, 575-586.

SMALLMAN, B.N. & PAL, R. (1957) - The activity and intracellular distribution of choline acetylase in Insect nervous tissue. Bull. ent. Soc. Amer. 3, 25.

SMITH, D.S. (1965) - Synapses in the Insect nervous system. In " The Physiology of the Insect Central Nervous System ". p. 39-57. Eds : J.E. Treherne & J.W.L. Beament. Academic Press, London & New-York.

SMITH, D.S. (1967) - The organization of the Insect neuropile. In " Invertebrate Nervous Systems, their Significance for Mammalian Neurophysiology". p.79-85. Ed. C.A.G. Wiersma . University Chicago Press. Chicago, Illinois.

SMITH, D.S. & TREHERNE, J.E. (1963) - Functional aspects of the organization of the Insect nervous system. In " Advances in Insect Physiology ". Vol.1, p.401-484. Eds : J.W.L. Beament, J.E. Treherne & V.B. Wigglesworth. Academic Press. London & New-York.

SMITH, D.S. & TREHERNE, J.E. (1965) - The electron microscopic localization of cholinesterase activity in the central nervous system of an Insect, *Periplaneta americana* . J. Cell. Biol. 26, 445-465.

SPIRA, M.E., PARNAS, I. & BERGMANN, F. (1969 a) - Organization of the giant axons of the Cockroach *Periplaneta americana* . J. Exp. Biol. 50, 615-627.

SPIRA, M.E., PARNAS, I. & BERGMANN, F. (1969 b) - Histological and electrophysiological studies on the giant axons of the Cokroach, *Periplaneta americana* . J. Exp. Biol. 50, 629-634.

STANDAERT, F.G. (1964) - The action of d-tubocurarine on the motor nerve terminal. J. Pharmacol. Exp. Therap. 143, 181-186.

STEFANI, E. & GERSCHENFELD, H.M. (1969) - Comparative study of acetylcholine and 5-hydroxytryptamine receptors on single Snail neurons. J. Neurophysiol. 32, 64-74.

STEGWEE, D. (1960) - The role of esterase in tetraethylpyrophosphate poisoning in the House-fly, *Musca domestica L.* Canad. J. Biochem. Physiol. 38, 1417-1430.

STEIGER, U. (1967) - Uber den Feinbau des Neuropils im *Corpus pedunculatum* der Waldameise. Z. Zellforsch. 81, 511-536.

STINNAKRE, J. (1970) - Action de l'hémicholinium sur une synapse centrale d'Aplysie. J. Physiol. Paris, 62, 452.

SUGA, N. & KATSUKI, Y. (1961) - Pharmacological studies on the auditory synapses in a Grasshopper. J. Exp. Biol. 38, 759-770.

TAKEUCHI, A. (1958) - The long-lasting depression in neuromuscular transmission of Frog. Jap. J. Physiol. 8, 102-113.

TAKEUCHI, A. & TAKEUCHI, N. (1962) - Electrical changes in pre- and postsynaptic axons of the giant synapse of *Loligo*. J. Gen. Physiol. 45, 1181-1193.

TAKEUCHI, A. & TAKEUCHI, N. (1965) - Localized action of γ-aminobutyric acid on the Crayfish muscle. J. Physiol. London, 177, 225-238.

TAKEUCHI, A. & TAKEUCHI, N. (1966 a) - A study of the inhibitory action of γ-aminobutyric acid on neuromuscular transmission in the Crayfish. J. Physiol. London, 183, 418-432.

TAKEUCHI, A. & TAKEUCHI, N. (1966 b) - On the permeability of the presynaptic terminal of the Crayfish neuromuscular junction during inhibition and the action of γ-aminobutyric acid. J. Physiol. London, 183, 433-449.

TAKEUCHI, A. & TAKEUCHI, N. (1969) - A study of the action of picrotoxin on the inhibitory neuromuscular junction of the Crayfish. J. Physiol. London, 205, 377-391.

TAUC, L. (1958) - Analyses unitaires d'activités synaptiques chez l'Aplysie révélant la mise en jeu de neurones intermédiaires dans le ganglion abdominal. J. Physiol. Paris, 50, 541-544.

TAUC, L. (1964) - Inhibition présynaptique dans les neurones centraux de l'Aplysie. C.R. Acad. Sci. Paris, 259, 885-888.

TAUC, L. (1965) - Presynaptic inhibition in the abdominal ganglion of *Aplysia*. J. Physiol. London, 181, 282-307.

TAUC, L. (1967) - Transmission in Invertebrate and Vertebrate ganglia. Physiol. Rev. 47, 521-593.

TAUC, L. (1968) - Heterosynaptically and homosynaptically induced presynaptic inhibition. In "Structure and Function of Inhibitory neuronal mechanisms ". p. 251-258. Pergamon Press. Oxford & New-York.

TAUC, L. & BRUNER, J. (1963) - " Desensitization" of cholinergic receptors by acetylcholine in Molluscan central neurones. Nature, London, 198, 33-34.

TAUC, L. & EPSTEIN, R. (1967) - Heterosynaptic facilitation as a distinct mechanism in *Aplysia*. Nature, London, 214, 724-725.

TAUC, L., EPSTEIN, R. & MALLART, A. (1965) - Action des ions Mg^{++} et Ca^{++} sur les potentiels postsynaptiques unitaires chez l'Aplysie. J. Physiol. Paris, 57, 284.

TAUC, L. & GERSCHENFELD, H.M. (1961) - Cholinergic transmission mechanisms for both excitation and inhibition in Molluscan central synapses. Nature, London, 192, 366-367.

TAUC, L. & GERSCHENFELD, H.M. (1962) - A cholinergic mechanism of inhibitory synaptic transmission in a Molluscan nervous system. J. Neurophysiol. 25, 236-262.

TEN BRUGGENCATE, G. & ENGBERG, I. (1971) - Iontophoretic studies in Deiters' nucleus of the inhibitory actions of GABA and related amino acids and the interactions of strychnine and picrotoxin. Brain Res. 25, 431-448.

THIES, R.E. (1965) - Neuromuscular depression and the apparent depletion of transmitter in Mammalian muscle. J. Neurophysiol. 28, 427-442.

THOMAS, R.C. & WILSON, V.J. (1966) - Marking single neurons by staining with intracellular recording microelectrodes. Science, N.Y. 151, 1538-1539.

TOBIAS, J.M. (1948) - Potassium, sodium and water interchange in irritable tissues and haemolymph of an omnivorous Insect, *Periplaneta americana* . J. Cell. Comp. Physiol. 31, 125-142.

TOBIAS, J.M., KOLLROS, J.J. & SAVIT, J. (1946) - Acetylcholine and related substances in the Cockroach, Fly and Crayfish and the effect of DDT. J. Cell. Comp. Physiol. 28, 159-182.

TREHERNE, J.E. (1962) - The distribution and exchange of some ions and molecules in the central nervous system of *Periplaneta americana L.* J. Exp. Biol. 39, 193-217.

TREHERNE, J.E. (1966) - The neurochemistry of Arthropods. Monographs in Exp. Biol. n° 14 , Cambridge University Press.

TREHERNE, J.E. & SMITH, D.S. (1965 a) - The penetration of acetylcholine in the central nervous tissues of an Insect (*Periplaneta americana L.*) J. Exp. Biol. 43, 13-21.

TREHERNE, J.E. & SMITH, D.S. (1965 b) - The metabolism of acetylcholine in the intact central nervous system of an Insect (*Periplaneta americana L.*) . J. Exp. Biol. 43, 441-454.

TRUJILLO-CENOZ, O. (1959) - Study on the fine structure of the central nervous system of *Pholus labruscae L.* (Lepidoptera). Z. Zellforsch. 49, 432-446.

TRUJILLO-CENOZ, O. (1962) - Some aspects of the structural organization of the Arthropod ganglia. Z. Zellforsch. 56, 649-682.

TSUKAHARA, N. & KOSAKA, K. (1968) - The mode of cerebral excitation of red nucleus neurons. Exp. Brain. Res. 5, 102-117.

TUCKER, L.E. & PICHON, Y. (1972) - Extraneuronal restriction and kinetics of 22Na efflux from sheathed and desheathed connective of *Periplaneta americana* . J. Exp. Biol. (sous presse).

TWAROG, B.M. & ROEDER, K.D. (1956) - Properties of the connective tissue sheath of the Cockroach abdominal nerve cord. Biol. Bull. 111, 278-286.

TWAROG, B.M. & ROEDER, K.D. (1957) - Pharmacological observations on the desheathed last abdominal ganglion of the Cockroach. Ann. entom. Soc. Amer. 50, 231-237.

TYSHTCHENKO, V.P. & MANDELSTAM, J.E. (1965) - A study of spontaneous electrical activity and localization of cholinesterase in the nerve ganglia of *Antheraea pernyi Guer.* at different stages of metamorphosis and in pupal diapause. J. Ins. Physiol. 11, 1233-1239.

UNGER, H. (1965) - Der Einfluss körpereigener Wirkstoffe auf die Nerventätigkeit von *Periplaneta americana L.* Zool. Jb. Physiol. Bd. 71, S., 727-740.

USHERWOOD, P.N.R. (1963) - Spontaneous miniature potentials from Insect muscle fibers. J. Physiol. London, 169, 149-160.

USHERWOOD, P.N.R. (1969) - Electrochemistry of Insect muscle. In " Advances in Insect Physiology ". Vol.6, p.205-278. Eds : J.W.L. Beament, J.E. Treherne & V.B. Wigglesworth. Academic Press. London & New-York.

USHERWOOD, P.N.R., COCHRANE, D.G. & REES, D. (1968) - Changes in structural, physiological and pharmacological properties of Insect excitatory nerve-muscles synapses after motor nerve section. Nature, London, 218, 589-591.

USHERWOOD, P.N.R. & GRUNDFEST, H. (1964) - Inhibitory postsynaptic potentials in Grasshopper muscle. Science, N.Y. 143, 817-818.

USHERWOOD, P.N.R. & GRUNDFEST, H. (1965) - Peripheral inhibition in skeletal muscles of Insects. J. Neurophysiol. 28, 497-518.

USHERWOOD, P.N.R. & MACHILI, P. (1966) - Chemical transmission at the Insect excitatory neuromuscular synapse. Nature, London, 210, 634-636.

USHERWOOD, P.N.R. & MACHILI, P. (1968) - Pharmacological properties of excitatory neuromuscular synapses in the Locust. J. Exp. Biol. 49, 341-361.

USHERWOOD, P.N.R., MACHILI, P. & LEAF, G. (1968) - L-glutamate at Insect excitatory nerve-muscle synapses. Nature, London, 219, 1169-1172.

VAN ASPEREN, K. & VAN ESCH, I. (1956) - The chemical composition of haemolymph in *Periplaneta americana*. Arch. neerl. Zool. 11, 342-360.

VAN DER KLOOT, W.G. (1955) - The control of neurosecretion and diapause by physiological changes in the brain of the *Cecropia* Silkworm. Biol. Bull. 109, 276-294.

VAN DER KLOOT, W.G. (1960) - Picrotoxin and the inhibitory system of Crayfish muscle. In " Inhibition in the Nervous System and Gamma-aminobutyric Acid". p.409-412. Ed: E. Roberts. Pergamon Press, New-York.

VAN DER KLOOT, W.G. & ROBBINS, J. (1959) - The effect of γ-aminobutyric acid and picrotoxin on the junctional potential and the contraction of Crayfish muscle. Experientia, 15, 35-36.

VERESHTCHAGIN, S.M., SYTINSKY, I.A. & TYSHTCHENKO, V.P. (1961) - The effect of γ-aminobutyric acid and β-alanine on bioelectrical activity of nerve ganglia of the Pine-Moth caterpillar (*Dendrolimus pini*). J. Ins. Physiol. 6, 21-25.

VON BAUMGARTEN, R.J. & HUKUHARA, T. (1969) - The role of the interstimulus interval in heterosynaptic facilitation in *Aplysia californica*. Brain Res. 16, 369-381.

VON BAUMGARTEN, R.J. & JAHAN-PARWAR, B. (1967) - Time course of repetitive heterosynaptic facilitation in *Aplysia californica*. Brain Res. 4, 295-297.

VON EULER, U.S. (1961) - Occurrence of catecholamines in Acrania and Invertebrates. Nature, London, 190, 170-171.

WALKER J.L. & BROWN, A.M. (1970) - Unified account of the variable effects of CO_2 on nerve cells. Science, N.Y. 167, 1502-1504.

WALL, P.D. (1959) - Repetitive discharge of neurons. J. Neurophysiol. 22, 305-320.

WEINREICH, D. (1971) - Ionic mechanism of post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the Frog. J. Physiol. London, 212, 431-446

WELSH, J.H. & MOORHEAD, M. (1960) - The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the Invertebrates, especially in their nervous systems. J. Neurochem. 6, 146-169.

WERMAN, R. (1966) - A review - Criteria for identification of a central nervous system transmitter. Comp. Biochem. Physiol. 18, 745-766.

WERMAN, R., DAVIDOFF, R.A. & APRISON, M.H. (1968) - The inhibitory action of glycine on spinal neurons in the Cat. J. Neurophysiol. 31, 81-95.

WIERSMA, C.A.G. (1941) - The efferent innervation of muscle. Biol. Symp. 3, 259-290.

WIGGLESWORTH, V.B. (1957) - The use of osmium in the fixation and staining of tissues. Proc. Roy. Soc.B, 147, 185-199.

WIGGLESWORTH, V.B. (1958) - The distribution of esterase in the nervous system and other tissues of the Insect, *Rhodnius prolixus*. Quart. J. micr. Sci. 99, 441-450.

WIGGLESWORTH, V.B. (1959 a) - The histology of the nervous system of an Insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). I. The peripheral nervous system. Quart. J. micr. Sci. 100, 285-298.

WIGGLESWORTH, V.B. (1959 b) - The histology of the nervous system of an Insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. The central ganglia. Quart. J. micr. Sci. 100, 299-313.

WIGGLESWORTH, V.B. (1960 a) - The nutrition of the central nervous system of the Cockroach, *Periplaneta americana*. The mobilization of reserves. J.Exp. Biol. 37, 500-512 .

WIGGLESWORTH, V.B. (1960 b) - Axon structure and the dictyosomes (Golgi bodies) in the neurones of the Cockroach, *Periplaneta americana* . Quart. J. micr. Sci. 101, 381-388.

WILLIS, W.D. & MAGNI, F. (1964) - The properties of reticulospinal neurons. In " Progress in Brain Research : Physiology of Spinal Neurons "Vol.12, p.56-61. Eds : J.C. Eccles & J.P.Schadé.Amsterdam = Elsevier.

YAMASAKI, T. & NARAHASHI, T. (1958) - Synaptic transmission in the Cockroach. Nature, London, 182, 1805-1806.

YAMASAKI, T. & NARAHASHI, T. (1959 a) - The effects of potassium and sodium ions on the resting and action potentials of the Cockroach giant axon. J. Ins. Physiol. 3, 146-158.

YAMASAKI, T. & NARAHASHI, T. (1959 b) - Electrical properties of the Cockroach giant axon. J. Ins. Physiol. 3, 230-242.

YAMASAKI, T. & NARAHASHI, T. (1960) - Synaptic transmission in the last abdominal ganglion of the Cockroach. J. Ins. Physiol. 4, 1-13.

ZAWARZIN, A. (1924 a) - Uber die histologische Beschaffenheit des unpaaren ventralen Nervs der Insekten (Histologische Studien über Insekten V). Z. Wiss. Zool. 122, 97-115.

ZAWARZIN, A. (1924 b) - Zur Morphologie der Nervenzentren. Das Bauchmark der Insekten. Ein Beitrage zur vergleichen Histologie (Histologische Studien über Insekten VI). Z. Wiss. Zool. 122, 323-424.

ZILBER-GACHELIN, N.F. (1966) - Habituation au niveau d'un ganglion abdominal chez la Blatte, *Blabera fusca* . J. Physiol. Paris, 58, 643.

ZILBER-GACHELIN, N.F. (1970) - Etude comportementale et électrophysiologique de quelques facteurs responsables de la variabilité des réponses motrices réflexes chez la Blatte. Thèse d'Etat, Paris, 187 p.

VU :

Le Président de la Thèse

J. BOISTEL

VU :

Le Directeur de Thèse

J. BOISTEL

VU ET APPROUVE

RENNES, le 21 Avril 1972
Le Directeur de l'U.E.R.
" Sciences Biologiques "

P. RAZET

VU ET PERMIS D'IMPRIMER N° 93 A

Rennes le 12 Mai 1972

Le Président de l'Université de RENNES,

C. CHAMPAUD